

Íris Guimarães Silva

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA GENGIVAL E SUBGENGIVAL  
DE SERES HUMANOS POR PCR**

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas  
Departamento de Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2007

Íris Guimarães Silva

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA GENGIVAL E SUBGENGIVAL  
DE SERES HUMANOS POR PCR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia

Área de Concentração: Propedêutica Complementar

Orientador: Edilberto Nogueira Mendes

Co-orientadora: Paula Prazeres Magalhães

Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas  
Departamento de Propedêutica Complementar/Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2007

## **COLABORAÇÃO**

Professores Luiz de Macedo Farias e Maria Auxiliadora Roque de Carvalho -  
Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

Professor José Eustáquio da Costa - Departamento de Periodontia, Faculdade de  
Odontologia, UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. EDILBERTO NOGUEIRA MENDES, pela confiança e paciência, por todos os ensinamentos e exemplo de profissionalismo, com você aprendi que sempre posso fazer melhor, pela convivência maravilhosa e amizade. Você foi fundamental para o meu crescimento profissional e conquistou lugar especial no meu coração. Muito obrigada por tudo!

A minha co-orientadora Profa. PAULA PRAZERES MAGALHÃES, pela dedicação, pela atenciosa orientação, estímulo e apoio. Obrigada pela amizade e carinho fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas, ANDRÉA, CAROLINE, DÉBORAH, LUIZA, MILAN, PEDRO, PRISCILA E VAGNER, pela convivência, amizade e apoio. Em especial ao ROGER, pela amizade, carinho e apoio fundamentais nesta caminhada.

A ANA CAROLINA, FABIANO E RODRIGO, pela realização de parte da colheita e experimentos.

Aos meus pais, pelo amor, dedicação, confiança e ensinamentos que foram fundamentais para enfrentar os desafios da vida.

Ao meu marido CÁSSIO, pelo amor, amizade, apoio e por todas às vezes que compreendeu minhas ausências nesta etapa tão importante para minha formação profissional. Preto, Te amo!

Ao meu filho ESTEVÃO que me acompanhou desde o início desta etapa e mesmo ainda no ventre foi minha principal fonte de inspiração e força para a realização deste trabalho. Você é um presente que Deus me deu, te amo muito!

A minha segunda família, meus sogros FÁTIMA e GIOVANI, meus cunhados CAMILA, CARLOS e CLEISON que sempre me apoiaram em todos os momentos e me acolheram com muito amor.

As minhas amigas INÊS, ANINHA e FABIANA, pelo carinho, apoio, incentivo e amizade sincera.

Ao Prof. GEOVANI DANTAS CASSALI e a Profa. ANA MARGARIDA MIGUEL FERREIRA NOGUEIRA, coordenador e subcoordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia, pela oportunidade.

A secretária do Centro de Pós-graduação, ELLEN, pela disponibilidade e atenção.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Patologia, pelos ensinamentos e pela forma que conduziram suas disciplinas.

A FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS (FAPEMIG), ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), e à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pelos recursos financeiros disponibilizados, essenciais para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

A **DEUS** que tornou tudo possível e me deu a alegria de ter tantos amigos para agradecer.

*Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé*

2 TIMÓTEO 4:7

## RESUMO

A microbiota indígena desempenha importantes funções na homeostasia, podendo constituir-se em importante reservatório de organismos para infecções tanto da cavidade oral como de outras regiões do organismo. A presença dos periodontopatógenos *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foi avaliada, por PCR, em espécimes gengivais/subgengivais de 237 indivíduos sem doença periodontal: 14 crianças antes da erupção dos dentes (grupo A), 47 de três a cinco anos (grupo B) e 42 de sete a 10 anos (grupo C), 34 adolescentes (grupo D), 20 adultos de 20 a 45 anos (grupo E), 19 com mais de 45 anos (grupo F), 48 edêntulos sem prótese total (grupo G) e 13 indivíduos com implante dental (grupo H). *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* foram observados em 116/48,9%, 79/33,3%, 155/65,4%, 0/0%, 2/0,8%, 21/8,8%, 46/19,4% e 36/15,2% indivíduos, respectivamente. *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foram os únicos microrganismos detectados em todos os grupos. No grupo A, apenas estes microrganismos foram observados. *P. intermedia* foi identificada apenas nos grupos C e E. Os indivíduos com implante dental apresentaram um perfil de periodontopatógenos semelhante ao dos adultos (grupos E/F) e uma maior proporção de microrganismos quando comparado com os indivíduos edêntulos. Observou-se relações sinérgicas entre *F. nucleatum*/*T. forsythia*, *F. nucleatum*/*P. nigrescens*, *F. nucleatum*/*E. corrodens* e *F. nucleatum*/*A. actinomycetemcomitans*. Relações antagonistas mútuas entre *T. denticola*/*P. intermedia*/*P. nigrescens*, *T. forsythia*/*P. intermedia*, *P. intermedia*/*F. nucleatum* e antagonistas entre *T. denticola*/*F. nucleatum*, *T. denticola*/*E. corrodens*, *T. denticola*/*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*/*F. nucleatum*, *T. forsythia*/*E. corrodens*, *T. forsythia*/*A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*/*E. corrodens*; *P. intermedia*/*A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens*/*T. forsythia*, *P. nigrescens*/*F. nucleatum*, *P. nigrescens*/*E. corrodens* e *P. nigrescens*/*A. actinomycetemcomitans* foram

observadas. A microbiota oral torna-se mais diversificada com a erupção dos dentes, evento relacionado a mudanças ambientais e alimentares do hospedeiro. As relações sinérgicas observadas entre *F. nucleatum* e quatro de seis espécies detectadas reforça o importante papel deste microrganismo na formação da

5 microbiota oral. Este é o primeiro trabalho, realizado no Brasil empregando PCR, que avalia a implantação da microbiota periodontal em diferentes fases da vida do indivíduo e a associação entre periodontopatógenos em indivíduos com periodonto saudável.



## ABSTRACT

The indigenous microbiota plays an important role in health and disease.

5 The human oral cavity is a complex biological system in which members of a diverse microbial community interact with themselves as well as with host structures and components. Members of this community change along lifetime and are diverse in different parts of the world, due to specific population habits and genetic characteristics. In order to understand better the alterations of the oral microbiota

10 associated with age, we investigated the presence of the periodontopathogens *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*, by PCR, in gingival/subgingival specimens obtained from 237 subjects with no clinical evidence of

15 gingival/periodontal lesions: 14 children before teeth eruption/A, 47 children 3-5 years old/B, 42 individuals from 7-10 years of age/C, 34 adolescents/D, 20 individuals with age ranging from 20-45 years/E, 19 adults older than 45 years/F, 48 edentulous individuals with no total prosthesis/G and 13 individuals with tooth implant/H. *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P.*

20 *intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* and *T. denticola* were detected in specimens obtained from 116/48,9%, 79/33,3%, 155/65,4%, 0/0%, 2/0,8%, 21/8,8%, 46/19,4% and 36/15,2% individuals, respectively. *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* were the only organisms found in all groups studied. In the group A, only these organisms were observed. *P. intermedia* was identified in the groups C and E only.

25 Individuals with tooth implant had a periodontopathogen profile similar to that found

in adults of the groups E and F and a higher organism diversity when compared with edentulous ones. Synergistic associations were found between *F. nucleatum*/*T. forsythia*, *F. nucleatum*/*P. nigrescens*, *F. nucleatum*/*E. corrodens* and *F. nucleatum*/*A. actinomycetemcomitans*. Mutual antagonist relationships were detected  
5 among *T. denticola*/*P. intermedia*/*P. nigrescens*, *T. forsythia*/*P. intermedia*, *P. intermedia*/*F. nucleatum*. Antagonist associations between *T. denticola*/*F. nucleatum*, *T. denticola*/*E. corrodens*, *T. denticola*/*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*/*F. nucleatum*, *T. forsythia*/*E. corrodens*, *T. forsythia*/*A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*/*E. corrodens*, *P. intermedia*/*A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens*/*T.*  
10 *for sythia*, *P. nigrescens*/*F. nucleatum*, *P. nigrescens*/*E. corrodens* and *P. nigrescens*/*A. actinomycetemcomitans* were observed. In conclusion, oral microbiota is more diverse after teeth eruption, probably due to environmental alterations induced by this event and to alimentary changes that occur simultaneously. Synergistic associations observed between *F. nucleatum* and four out of the six  
15 periodontopathogens detected reinforces the hypothesis that this organism plays an important role in the development and maintenance of the oral microbiota. This investigation is the first study that employs PCR to analyse the oral microbiota constitution in different age groups in a Brazilian population and, also, to study the association between periodontopathogens in individuals with no evident periodontal  
20 lesions.

## LISTA DE QUADROS

1. Reações de amplificação empregadas para detecção de eubactérias e identificação de periodontopatógenos..... 26

## LISTA DE TABELAS

1. Frequência de detecção de periodontopatógenos em espécimes gengivais e subgengivais de indivíduos com periodonto saudável por PCR..... 29
2. Associações entre periodontopatógenos em espécimes clínicos obtidos de 237 indivíduos com periodonto saudável..... 31
3. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de crianças antes da erupção dos dentes (n = 14)..... 32
4. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de crianças com dentição decídua completa (n = 47)..... 33
5. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de crianças na faixa etária de 7 a 10 anos de idade (n = 42)..... 34
6. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de adolescentes (n = 34)..... 36
7. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de adultos com idade entre 20 e 45 anos (n = 20)..... 37
8. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de adultos com idade superior a 45 anos (n = 19)..... 38
9. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de edêntulos (n = 48)..... 39
10. Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de pacientes com implante dental (n = 13)..... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleotídeo trifosfato

*E. coli*: *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

F: forward

NaCl: cloreto de sódio

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

OR: Odds ratio (razão de chance)

pb: pares de bases

PCR: reação de polimerização em cadeia

pH: potencial hidrogeniônico

R: reverse

rDNA 16S: DNA ribossômico 16S

RNase A: ribonuclease A

SDS: dodecilsulfato de sódio

*Taq* DNA polimerase: *Thermus aquaticus* DNA polimerase

UV: ultravioleta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	Objetivo geral.....	18
3.2	Objetivos específicos.....	18
4	POPULAÇÃO ESTUDADA E MÉTODOS.....	19
4.1	Seleção dos pacientes e obtenção do espécime clínico.....	20
4.2	Processamento do espécime.....	21
4.3	Extração de DNA.....	22
4.4	Pesquisa de microrganismos por PCR.....	23
4.5	Associações entre os grupos bacterianos pesquisados .....	24
4.6	Análise estatística.....	25
5	RESULTADOS.....	27
5.1	Prevalência de periodontopatógenos.....	28
5.2	Associações entre os grupos bacterianos.....	30
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
	ANEXOS.....	66
	Anexo I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	67
	Anexo II – Ficha Clínica.....	69
	Anexo III – Termo de Consentimento.....	73

## **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

---

A importância da microbiota indígena para os seres humanos é indiscutível, uma vez que ela desempenha importantes funções, entre elas, contribui para o desenvolvimento do sistema imune, dificulta a implantação de microrganismos patogênicos e produz substâncias úteis para o hospedeiro e para  
5 outras espécies bacterianas presentes nesta microbiota. Por outro lado, na cavidade oral, está associada, principalmente, à etiologia da cárie e da doença periodontal, doenças infecciosas bastante prevalentes em todo o mundo. Acredita-se que a cavidade oral albergue mais de 700 espécies bacterianas, a maior parte representada por organismos anaeróbios obrigatórios. Porém, apenas alguns  
10 membros desta microbiota são considerados periodontopatógenos, associados, portanto, à etiopatogeniada doença periodontal, em situações em que o equilíbrio entre microbiota e hospedeiro é rompido. Entre os periodontopatógenos putativos, podem ser citados *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tanerella forsythia*  
15 (anteriormente denominado *Bacteroides forsythus* e *Tanerella forsythensis*), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas. gingivalis*, *Prevotella. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e treponemas.

A maior parte do conhecimento sobre a microbiota da cavidade oral foi  
20 obtida por métodos dependentes de cultura, os quais apresentam várias limitações. Microrganismos presentes em quantidades pequenas ou fastidiosos geralmente não são detectados por estes métodos. Além disto, não existem meios de cultura artificiais que possibilitem o isolamento de inúmeras espécies. Por estas razões, acredita-se que cerca de 50% das espécies constituintes da microbiota da cavidade  
25 oral ainda não tenham sido isoladas.

Com o advento de métodos de genética molecular, sensíveis, específicos, de execução rápida e passíveis de emprego em larga escala, grandes avanços no conhecimento da constituição da microbiota da cavidade oral e das relações entre os membros desta microbiota têm ocorrido. Muitas espécies desconhecidas anteriormente foram detectadas e outras foram re-classificadas. Além disto, o emprego desta metodologia permitiu o avanço na compreensão do papel de tais microrganismos na etiopatogenia de doenças como periodontite, gengivite e cárie.

Por estes motivos e devido à inexistência de investigações sistematizadas, empregando métodos de genética molecular, relativas à constituição da microbiota periodontal em diferentes fases da vida do indivíduo, especialmente no Brasil, desenvolvemos este estudo que pretende contribuir para o conhecimento da microbiota oral em diferentes faixas etárias. Os resultados poderão ser utilizados no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento da doença periodontal.

15





A microbiota indígena, comunidade de microrganismos que habita a pele e mucosas de indivíduos saudáveis, desempenha importantes funções em seres humanos e outros animais: contribui para o desenvolvimento e modulação do sistema imune, dificulta a implantação de microrganismos patogênicos e produz substâncias úteis para o hospedeiro (MARSH & MARTIN, 1992). Constitui, também, importante reservatório de microrganismos potencialmente patogênicos que podem ser responsáveis por processos infecciosos em diversas regiões do organismo (FINEGOLD et al., 1993; MARSH & MARTIN, 1992; MCNABB & TOMASI, 1981; SAVAGE, 1977).

Na cavidade oral, a microbiota está associada, principalmente, com a etiologia de duas doenças infecciosas bastante prevalentes no ser humano em todas as regiões do mundo - a cárie e a doença periodontal – resultantes da alteração do equilíbrio dinâmico entre fatores de defesa do hospedeiro e microbiota indígena (LOESCHE, 1986; MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992; MOORE & MOORE, 1994; VAN HOUTE, 1994).

A cavidade oral do recém nascido é estéril, até que ele entre em contato com o ambiente. Os microrganismos inicialmente adquiridos são provenientes de contaminação passiva com a microbiota da mãe e das substâncias ingeridas pela criança, bem como originários de indivíduos que convivem com a mesma (GREENSTEIN & LAMSTER, 1997; MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992). Embora em contato direto com o ambiente externo, o que cria oportunidade para a aquisição de microrganismos, a cavidade oral é altamente seletiva. Poucas espécies, usualmente membros da microbiota oral do adulto, são capazes de colonizar a mucosa oral do recém nascido (MARSH & MARTIN, 1992).

Os microrganismos inicialmente adquiridos multiplicam-se e colonizam as superfícies da boca até que encontrem resistência, conferida por barreiras físicas e químicas, entre elas a descamação de células epiteliais, o fluxo de saliva, a presença de nutrientes, o pH, o potencial de oxirredução, as propriedades antimicrobianas da saliva e outros mecanismos de defesa do hospedeiro (MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992; MARSH, 2000). Com o decorrer do tempo, o metabolismo da comunidade bacteriana estabelecida modifica o ambiente, permitindo a implantação de outros grupos de microrganismos (MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992). Assim, a microbiota inicialmente implantada pode influenciar o padrão de colonização das estruturas da boca e, em consequência, a constituição da microbiota de determinado indivíduo (MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992; PREUS et al., 1994; SCHENKEIN et al., 1993). Finalmente, uma situação estável é atingida, na qual uma grande diversidade de microrganismos passa a constituir a microbiota oral. Esta microbiota, entretanto, sofre alterações constantes, qualitativas e quantitativas. Ela se altera ao longo da vida, sendo influenciada não apenas por fatores microbianos e do hospedeiro, mas também por fatores ambientais (KÖNÖNEN et al., 1992; MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992).

No início da vida, a cavidade oral apresenta apenas superfícies epiteliais e a microbiota consiste, principalmente, de bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella* e *Actinomyces* que formam a primeira comunidade neste sítio (JENKINSON & LAMONT, 2005).

Simultaneamente à erupção dos dentes, observa-se a colonização por *Streptococcus sanguinis*, que apresenta relações metabólicas com *Veillonella* e *Actinomyces*, e também favorece a fixação de *Porphyromonas*. As mudanças no

ambiente, que se torna anaeróbio, favorecem o aumento da proporção de *Fusobacterium*, que tem a capacidade de se relacionar com diversas espécies formando comunidades mais complexas (JENKINSON & LAMONT, 2005).

Ao longo da vida do indivíduo, a microbiota oral continua a sofrer alterações.

5 Os treponemas e as bactérias anaeróbias obrigatórias produtoras de pigmento negro, que se tornam comuns após o surgimento dos dentes, aumentam em frequência com a idade, tendo sido proposto que a maior prevalência de tais grupos bacterianos na puberdade está relacionada a alterações hormonais (GUSBERTI et al., 1990).

10 Nos adultos, a constituição da microbiota oral permanece relativamente estável, em consequência do balanço dinâmico entre os próprios microrganismos, entre microrganismos e hospedeiro e entre estes e o ambiente (GIBBONS, 1989).

15 Nos indivíduos idosos, as mudanças na microbiota oral refletem, provavelmente, alterações importantes do hospedeiro e do ambiente, referentes, entre outros, a fatores hormonais, imunidade e uso de medicamentos. Nesta faixa etária, aumenta a frequência de lactobacilos, estafilococos e leveduras (MOUTON & ROBERT, 1995).

20 Mais de 700 espécies bacterianas têm sido detectadas na cavidade oral de seres humanos (AAS et al., 2005; PEREA, 2004; SAKAMOTO et al., 2005). O ambiente não é uniforme, podendo ser distinguidos diversos *habitat*, cada um deles com características físico-químicas próprias, o que torna possível a colonização por diferentes comunidades de microrganismos (MARCOTTE & LAVOIE, 1998; MARSH & MARTIN, 1992). Em parte, esta diferenciação é devida à diversidade de estruturas anatômicas da cavidade oral, os dentes, estruturas rígidas que não sofrem descamação, e as mucosas. A implantação dos dentes cria, pelo menos, dois diferentes

*habitat* no periodonto: subgingival e supragingival. De forma semelhante, a mucosa das diferentes regiões da boca apresenta características diferentes, originando diferentes *habitat* e, em consequência, microbiota de constituição diversa (HILL & MARSH, 1990).

5 Os primeiros relatos que sugerem a complexidade da microbiota periodontal podem ser atribuídos a Leeuwenhoek que, em 1683, observou formas vivas, então denominadas animálculos, em espécime de placa dental, que, pela descrição morfológica realizada pelo autor, parece tratar-se de espiroquetas (CHAN et al., 2000). Desde o início da era bacteriológica, diversos estudos têm avaliado a composição desta  
10 microbiota, empregando-se microscopia óptica e eletrônica, métodos de cultura, técnicas imunológicas e, mais recentemente, de genética molecular, como a PCR (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

Na região periodontal, os microrganismos formam uma massa densa denominada biofilme dental (HILL & MARSH, 1990; MARSH & BRADSHAW, 1995), cuja  
15 composição é variável, de acordo com a região onde se forma e com sua própria evolução. Embora observados em locais próximos ao ligamento periodontal e ao tecido conjuntivo, poucos microrganismos da microbiota do periodonto são capazes de induzir lesão em indivíduos saudáveis (DARVEAU et al., 1997). Para causar doença, os periodontopatógenos putativos não agem independentemente; muitas espécies pouco  
20 virulentas ou avirulentas contribuem para a doença periodontal, facilitando o processo de adesão das espécies virulentas e provendo-as de fatores de crescimento (ALI et al., 1994). De fato, é amplamente conhecido que as diversas espécies da microbiota oral interagem em relações sinérgicas ou antagonistas. Ali et al. (1994) observaram relações sinérgicas entre *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*,

*Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*. *P. intermedia* estava presente apenas em sítios que também albergavam *F. nucleatum* e a presença deste microrganismo favorecia o aumento populacional de *P. gingivalis* e *T. forsythia*. Alguns estudos que buscaram avaliar a relação entre *T. denticola* e *P. gingivalis* permitiram

5 concluir que há uma relação sinérgica entre estas espécies na qual há uma cooperação para o crescimento de ambas durante a formação do biofilme dental (DAVEY & COSTERTON, 2006). Sharma et al. (2005) encontraram relação sinérgica entre *T. forsythia* e *F. nucleatum* no desenvolvimento de biofilmes mistos e a interação célula-célula é fundamental para este fenômeno.

10 Durante a formação do biofilme dental, a interação entre diferentes microrganismos é fundamental para a formação de comunidades complexas (SHARMA et al., 2005). Cada biofilme formado difere em complexidade dependendo de sua localização e de fatores genéticos e ambientais de cada indivíduo (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

15 Muitas bactérias da microbiota subgingival são consideradas agentes de doenças periodontais. Na maioria das vezes, tais bactérias não lesam os tecidos, demonstrando que, embora necessários, os microrganismos apenas não são suficientes para causar doença (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1999). Em condições de saúde, há um equilíbrio dinâmico entre as bactérias da microbiota subgingival e o

20 sistema de defesa do hospedeiro. Em algumas situações, o equilíbrio pode ser rompido pela multiplicação excessiva de determinado grupo microbiano ou por diminuição das defesas do hospedeiro, surgindo a doença periodontal (GRENIER & MAYRAND, 2000; LIÉBANA et al., 2004; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1999).

As doenças periodontais são comumente classificadas em gengivite, que afeta somente o tecido gengival, e periodontite, que acomete o tecido periodontal de suporte, incluindo o ligamento periodontal e o osso alveolar (GRENIER e MAYRAND, 2000).

5 Na periodontite, há alteração quantitativa de certas espécies bacterianas, principalmente Gram negativas, associadas à formação de bolsa periodontal. A progressão da periodontite ocorre, usualmente, de forma episódica, com fases de atividade e inatividade de destruição tecidual, característica que reflete alterações da microbiota e da resposta imune (GRENIER e MAYRAND, 2000).

10 Parecem existir discrepâncias significativas na incidência de periodontite em populações jovens, adultas e idosas de diferentes regiões geográficas. Indivíduos africanos apresentam maior prevalência de periodontite, seguidos pelos hispânicos e asiáticos. A relação entre *status* periodontal e características sócio-econômicas também pode ser observada, sendo a doença mais grave em populações mais pobres, sem  
15 acesso a tratamento periodontal adequado. A susceptibilidade à doença periodontal nestas populações parece, ainda, ser agravada pela presença de fatores de risco biológicos que aumentam a predisposição à doença (ALBANDAR e RAMS, 2002).

Apesar das centenas de espécies que constituem a microbiota subgengival, apenas algumas são consideradas patógenos periodontais. Entre elas, podem ser  
20 citadas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente denominada *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (NORSKOV-LAURITSEN & KILIAN, 2006), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* (anteriormente denominada *Bacteroides forsythus* e

*Tanerella forsythensis*) e treponemas (KOOK et al., 2005; MARCOTTE & LAVOIE, 1998; SAKAMOTO et al., 2005; ZAMBON, 1996).

*A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* estão fortemente relacionados com a etiopatogenia da doença periodontal, sendo raramente observados em sítios saudáveis (TRAN & RUDNEY, 1996). *A. actinomycetemcomitans* está associado com periodontite agressiva localizada e *P. gingivalis* com a forma crônica da doença (DAVEY & COSTERTON, 2006). De acordo com Riggio et al. (1996), tais microrganismos apresentam relação antagonista quando presentes no mesmo sítio.

*A. actinomycetemcomitans* é um bastonete Gram negativo, que apresenta a habilidade de invadir células epiteliais e endoteliais e de produzir uma potente leucotoxina, cuja presença está associada a maior virulência (DAVEY & COSTERTON, 2006).

*P. gingivalis* é um bastonete Gram negativo imóvel, anaeróbico obrigatório, que requer ferro, sobrevivendo apenas em sítios com provisão nutricional complexa e tensão reduzida de oxigênio, como a região subgengival. Apresenta adesinas, hemaglutininas e proteinases que podem contribuir para a virulência da bactéria (LAMONT & JENKINSON, 2000).

*E. corrodens* é apontada, por alguns autores, como associada à destruição de tecidos orais; outros autores, entretanto, não observaram associação com doença. Em sítios doentes, colonizados por *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* aumenta significativamente, sugerindo haver interação sinérgica entre as duas espécies (DARBY & CURTIS, 2001).

*F. nucleatum* é um patógeno freqüentemente isolado de sítios com manifestações de doença periodontal e desempenha importante papel na gênese de



infecções em outras regiões do organismo (KULEKCI et al., 2001). É considerado importante no desenvolvimento do biofilme dental por facilitar a colonização por outras bactérias, através de mediadores de co-agregação, e por modificar o ambiente, tornando-o adequado a outros anaeróbios obrigatórios (SHARMA et al., 2005).

5            *P. intermedia* e *P. nigrescens* apresentam 94% de similaridade no que se refere à estrutura do rDNA 16S, ambas são habitantes freqüentes das bolsas periodontais e são dificilmente distinguidas por métodos dependentes de cultura. PCR baseada no rDNA 16S detecta cada uma delas sem a evidência de reações cruzadas, conforme Ashimoto et al. (1996). Alguns estudos indicam que *P. intermedia* é mais  
10 comum em sítios com doença periodontal enquanto *P. nigrescens* predomina em sítios saudáveis. Outros autores, entretanto, sugerem que *P. nigrescens* é mais comum em crianças, em indivíduos com doença periodontal e/ou infecções endodônticas (PEARCE et al., 2000).

*T. forsythia* é um anaeróbio extremamente fastidioso, o que dificulta sua  
15 detecção por métodos cultura-dependentes. Vários estudos, empregando PCR, associaram a presença deste microrganismo com periodontite crônica. Por outro lado, alguns autores também associaram a bactéria à forma agressiva de periodontite. Estudos comparando cultura e PCR para detecção de *T. forsythia* permitiram concluir que PCR é mais sensível para detecção do microrganismo (TANNER et al., 2006).

20            *T. denticola* é freqüentemente detectado em pacientes com periodontite (SAKAMOTO et al., 2005). Espiroquetas podem representar 50% dos microrganismos detectados na placa subgingival de pacientes acometidos por gengivite úlcero-necrosante aguda e periodontite crônica do adulto, sendo detectada em apenas 1% dos sítios saudáveis. *T. denticola* tem a capacidade de se locomover em fluidos viscosos, o

que, aparentemente, lhe confere vantagem ecológica uma vez que possibilita sua penetração nos sulcos gengivais e nos tecidos adjacentes (CHAN et al., 2000).

Socransky et al. (1998), empregando sondas de rDNA 16S, agruparam algumas espécies bacterianas em complexos de acordo com sua relação com doença periodontal. O complexo verde (*Capnocytophaga* sp, *Campylobacter concisus*, *Eubacterium nodatum*) e o complexo amarelo (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*) não estão associados com doenças periodontais. O complexo púrpura (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*) está associado ao sangramento à sondagem e está relacionado com os complexos laranja (*F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus constellatus*) e vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) que estão fortemente associados com a doença periodontal (FENG & WEINBERG, 2006). A seqüência de colonização por estes complexos pode determinar o surgimento de gengivite. A colonização inicial parece envolver membros dos complexos amarelo, verde e púrpura. Isto conduz à sucessão autogênica na qual os membros dos complexos laranja e vermelho se tornam dominantes. O aumento na proporção destes microrganismos, hipoteticamente, induz mudanças ambientais que levam à manifestação clínica de gengivite (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

Existe consenso que a composição da placa dental contribui para o início e a progressão da periodontite já que serão as espécies bacterianas presentes neste sítio que determinarão o nível de destruição tecidual. As espécies do complexo vermelho e *A. actinomycetemcomitans* (no caso da periodontite agressiva), são consideradas mais virulentas e com maior poder de destruição do que qualquer outra espécie do biofilme dental. Isto é resultado das várias habilidades que estas espécies apresentam, como

capacidade de colonização do sítio subgengival, de invasão, de produção de proteases e exotoxinas e de interferência na resposta imunológica do hospedeiro (FENG & WEINBERG, 2006).

A maior parte do conhecimento referente à composição da microbiota dos  
5 diversos sítios da cavidade oral advém de estudos empregando métodos  
microbiológicos convencionais, que envolvem isolamento e identificação dos  
microrganismos em meios de cultura artificiais. Apenas com o desenvolvimento de  
metodologia adequada para isolamento de bactérias anaeróbias estritas, que  
constituem a grande maioria dos membros desta microbiota, é que se passou a  
10 compreender melhor não apenas sua composição, mas, ainda, a inter-relação entre os  
membros daquela comunidade microbiana. Contudo, o isolamento e identificação de  
microrganismos em condições de anaerobiose é um método dispendioso, demorado,  
que requer a existência de infra-estrutura complexa, de difícil manutenção e pessoal  
treinado, além de não apresentar sensibilidade suficiente para a detecção de  
15 quantidade pequena de organismos viáveis. E mesmo o isolamento de espécies  
presentes em quantidade apreciável é dificultado pela grande quantidade e diversidade  
de outros organismos presentes na microbiota da cavidade oral.

O emprego de métodos de genética molecular, passíveis de serem utilizados  
em larga escala, certamente, vem contribuindo para aprimorar nosso conhecimento  
20 relativo à constituição da microbiota das diversas regiões do organismo, inclusive da  
cavidade oral. Tais métodos possibilitaram a detecção e o estudo de microrganismos  
ainda não isolados em meios de cultura artificiais. De fato, calcula-se que cerca de 50%  
dos microrganismos que constituem a microbiota oral não foram, ainda, cultivados (AAS  
et al., 2005; SIQUEIRA Jr E RÔÇAS, 2005). Desta forma, métodos genéticos podem

contribuir de forma substancial para o conhecimento da microbiota oral e, em conseqüência, para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção e o tratamento da cárie e da doença periodontal.

Com a ampliação do emprego destes métodos, numerosos estudos relativos  
5 à biologia de microrganismos têm sido divulgados nos últimos anos, inclusive referentes ao diagnóstico e à detecção de fatores de virulência de odontopatógenos. Flemmig et al. (1995) testaram a sensibilidade e especificidade da PCR, em comparação com o método cultura-dependente, para a detecção de *A. actinomycetemcomitans* e concluíram que a PCR é mais sensível e específica do que a cultura. Riggio et al.  
10 (1996) compararam PCR e cultura para a detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* e observaram *A. actinomycetemcomitans* em 24% e 15% dos espécimes, respectivamente, quando PCR e cultura foram empregadas, e *P. gingivalis* em 24% e 11% das amostras quando os métodos genético e cultura-dependente foram utilizados, respectivamente. Os autores concluíram que PCR é um método mais acurado do que  
15 cultura para a detecção destes microrganismos em amostras de placas subgingivais.

Em 2002, Avila-Campos et al. empregaram cultura e PCR para identificação de oito periodontopatógenos em amostras de placa subgingival de indivíduos com periodonto saudável e de pacientes com periodontite. Concluíram que, para ambos os grupos, a detecção por PCR foi superior. Observaram, ainda, que *T. denticola* foi  
20 detectada apenas por PCR, o que demonstra maior sensibilidade do método para detecção de um microrganismo extremamente fastidioso.

A pesquisa da colonização idade-dependente dos tecidos periodontais por bactérias periodontopatogênicas pode representar um importante instrumento na prevenção e tratamento da doença periodontal. Além disso, faz-se necessário o estudo

de cada uma delas para o entendimento de seu papel na etiologia da doença mencionada. Estudos sistematizados, empregando métodos de genética molecular para estudo da implantação da microbiota periodontal em diferentes fases da vida do indivíduo, especialmente no Brasil não foram, ainda, realizados.

5



### 3.1. Objetivo Geral

- 5
- Contribuir para o conhecimento da implantação da microbiota periodontal em diferentes fases da vida do indivíduo, o que poderá ajudar no desenvolvimento de estratégias de prevenção da doença periodontal.

### 3.2. Objetivos Específicos

10

- Avaliar a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*, por PCR, em indivíduos de diferentes faixas etárias, sem manifestação clínica de doença periodontal.
- 15
- Avaliar a ocorrência de associações sinérgicas e/ou antagonistas entre os microrganismos detectados no estudo.

## **4 POPULAÇÃO ESTUDADA E MÉTODOS**

---



Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo I).

#### 5 4.1. Seleção dos Pacientes e Obtenção do Espécime Clínico

Foram estudados 237 indivíduos, de nível sócio-econômico baixo, sem sinais de desnutrição e que não apresentavam manifestações clínicas ou história de doença periodontal: 14 crianças antes da erupção dos dentes (grupo A), 47 crianças com dentição decídua completa com idade entre três e cinco anos Grupo B), 42 crianças na faixa etária de sete a 10 anos (grupo C), 34 adolescentes (13 a 15 anos) (grupo D), 20 adultos com idade entre 20 a 45 anos (grupo E), 19 adultos com idade superior a 45 anos (grupo F), 48 adultos edêntulos sem prótese total (grupo G) e 13 pacientes com implante dental (grupo H). Todos os indivíduos foram atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais ou foram recrutados em creches e abrigos para idosos. Dados clínicos foram registrados em ficha própria (Anexo II).

Para obtenção do espécime clínico, após isolamento relativo da área com roletes de algodão esterilizados, hastes flexíveis com pontas de algodão estéreis foram friccionadas delicadamente na gengiva de crianças sem dentição decídua e de adultos edêntulos ou cones de papel absorvente foram inseridos nos sulcos periodontais e peri-implantes dos indivíduos dentados, sendo transferidos, após 60 s, para tubo de microcentrífuga contendo 1,0 mL de água mili-Q estéril. Dos indivíduos dentados, foram também obtidas amostras de placa bacteriana

subgengival por meio de raspagem delicada, com o auxílio de cureta periodontal. As amostras obtidas foram transferidas para o tubo correspondente contendo a amostra previamente colhida do mesmo paciente. Durante o procedimento de obtenção da amostra biológica, evitou-se contaminação com material de outras áreas da cavidade oral.

Não foram incluídos indivíduos que não concordaram em participar do estudo (assinatura do termo de consentimento pelo paciente ou por seu responsável legal – Anexo III), que tinham sido submetidos a tratamento periodontal ou utilizado drogas antimicrobianas ou antiinflamatórias no mês anterior à obtenção do material, ou portadores de alterações sistêmicas, como distúrbios de coagulação.

#### **4.2. Processamento do Espécime**

15

O material foi transportado, em banho de gelo, para o Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG. No prazo máximo de 2 h, os tubos contendo os espécimes foram submetidos a agitação em vórtex para dispersão da maior quantidade possível de microrganismos. Após remoção dos cones, os tubos foram centrifugados a 12000 x g, a 4°C, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento utilizado para extração de DNA.

### 4.3. Extração de DNA

DNA foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio (Fox et al., 1994),  
5 ligeiramente modificado. Em resumo, os sedimentos dos espécimes foram  
homogeneizados em tampão STET (sacarose<sup>1</sup> 8%, Tris-HCl<sup>2</sup> 50 mM, EDTA<sup>3</sup> 50 mM,  
Triton X-100<sup>4</sup> 0,1%; pH 8,0). A seguir, foram adicionados SDS<sup>5</sup> (concentração final  
1,5%) e RNase<sup>6</sup> (concentração final 0,02 µg/µL). O material foi homogeneizado e,  
após 1 h de incubação a 37°C, foi adicionada proteinase K<sup>7</sup> (concentração final 0,7  
10 µg/µL). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 37°C. Após cerca de 12 h,  
NaCl<sup>8</sup> (concentração final 0,7 µmol/µL) e solução contendo partes iguais de CTAB<sup>9</sup>  
5% e NaCl 0,7 M (concentração final 1:10) foram adicionadas e a suspensão foi  
agitada delicadamente e incubada por 10 min, a 56°C. DNA foi, então, extraído em  
mistura de fenol<sup>10</sup> e clorofórmio<sup>11</sup> (1:1) e precipitado a -20°C com acetato de sódio<sup>12</sup>  
15 0,3 M (concentração final 2,6 µmol/µL) e, aproximadamente, 2 volumes de etanol  
absoluto<sup>13</sup>. A suspensão foi centrifugada a 12000 x g por 75 min e, após evaporação  
do etanol residual, foram acrescentados dois volumes de etanol 70%. O material foi

---

<sup>1</sup> Inlab, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos

<sup>3</sup> Life, Gaithersburg, MD, Estados Unidos

<sup>4</sup> Calbiochem, La Jolla, CA, Estados Unidos

<sup>5</sup> Calbiochem

<sup>6</sup> Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos

<sup>7</sup> Life

<sup>8</sup> Sigma

<sup>9</sup> Sigma

<sup>10</sup> Invitrogen

<sup>11</sup> Merck<sup>a</sup>, Darmstadt, Alemanha

<sup>12</sup> Sigma

<sup>13</sup> Merck<sup>a</sup>

novamente centrifugado a 12000 x g, por 25 min, e o sedimento de DNA foi diluído em água quimicamente pura estéril<sup>14</sup>.

#### 5 4.4. Pesquisa de microrganismos por PCR

Antes da realização de reação específica para a identificação de cada microrganismo, todas as amostras foram submetidas a PCR para detecção de eubactérias empregando-se *primers* cujo alvo é orDNA 16S, etapa que permitiu  
10 confirmar a presença de DNA bacteriano amplificável nos espécimes.

DNA extraído das amostras foi adicionado a uma mistura de reação (volume final de 20 µL) consistindo de tampão (concentração final Tris-HCl 10 mM – pH 8,4, KCl 25 mM), MgCl<sub>2</sub> (em concentração de 1,0 mM ou 1,5 mM, de acordo com  
15 o protocolo de cada reação), 200 µM de cada dNTP<sup>15</sup>, 0,1 a 1,0 µM de cada *primer*<sup>16</sup>, conforme o protocolo, e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase<sup>17</sup>. Os tubos contendo a mistura de reação foram transferidos para termociclador<sup>18</sup>, empregando-se condições de reação variáveis, para a confirmação da presença de DNA bacteriano amplificável e detecção de cada microrganismo pesquisado (Quadro 1).

20 Cada reação incluiu controles positivo, negativo (*E. coli* ATCC 25922) e negativo interno (água quimicamente pura). Os controles positivos utilizados foram: *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *E. corrodens* (ATCC 23834), *F.*

---

<sup>14</sup> LiChrosolv, Merck

<sup>15</sup> Promega, Madison, WI, Estados Unidos

<sup>16</sup> Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA

<sup>17</sup> Phoeutria, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>18</sup> MJ Research, Watertown, MA, Estados Unidos

*nucleatum* (ATCC 10953), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *P. intermedia* (ATCC 25611), *P. nigrescens* (ATCC 33563), *T. forsythia* (ATCC 43037) e *T. denticola* (ATCC 33521).

Os produtos amplificados foram discriminados por eletroforese em gel de poliacrilamida<sup>19</sup> 8%, empregando-se tampão Tris-Borato<sup>20</sup>-EDTA (Sambrook et al., 1989). Após coloração com brometo de etídio<sup>21</sup> 2,5 µg/mL, o gel foi examinado em transluminador de luz UV<sup>22</sup>. Padrão de 100 pb<sup>23</sup> foi empregado como marcador de massa molecular.

10

#### **4.5. Associações entre os grupos bacterianos pesquisados**

A probabilidade de ocorrência de relações sinérgicas e antagonistas entre os microrganismos detectados nas amostras foi calculada como descrito por Hilman et al. (1985).

---

<sup>19</sup> Sigma

<sup>20</sup> Synth, Diadema, SP, Brasil

<sup>21</sup> Sigma

<sup>22</sup> Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos

<sup>23</sup> Difco, Sparks, MD, Estados Unidos

#### 4.6 Análise estatística

O cálculo de OR, para análise das relações sinérgicas ou antagonistas entre os microrganismos, considerou o risco relativo de se detectar a amostra teste na presença da efetora e foi calculado pela proporção de indivíduos onde a amostra teste foi encontrada juntamente com a amostra efetora dividido pelo número de indivíduos onde a amostra teste estava presente sem a efetora. Valores superiores a 2,0 e inferiores a 0,5 indicavam relações sinérgicas e antagonistas, respectivamente (Hilman et al.,1985).

QUADRO 1

Reações de amplificação empregadas para detecção de eubactérias e identificação de periodontopatógenos

Alvo	Seqüência do <i>primer</i>	[primer] ( $\mu$ M)	[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)	Programa	Amplicon (pb)	Fonte
rDNA 16S (eubactéria)	F: 5'-GATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-3' R: 5'-CCCGGGAACGTATTCACCG- 3'	0,8	1,5	95°C/2 min 95°C/30 s, 60°C/1 min, 72°C/1 min – 36X 72°C/2 min	602	3
<i>Agregatibacter actinomycetemcomitans</i>	F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCA-3' R: 5'-CTTTCGCACATCAGCGTCACATCCCCAAGG-3'	1,0	1,5	94°C/3 min 94°C/1 min, 64°C/1 min, 72°C/2,5 min – 40X 72°C/5 min	770	27
<i>Eikenella corrodens</i>	F: 5'-CTAATACCGCATAACGTCCTAAG-3' R: 5'-CTACTAAGCAATCAAGTTGCC-3'	1,0	1,5	95°C/2 min 95°C/30s, 60°C/1 min, 72°C/1 min – 36X 72°C/2 min	688	3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F: 5'-CTAAATACGTGCCAGCAGCC-3' R: 5'-CGACCCCCAACACCTAGTAA-3'	0,5	1,5	94°C/3 min 94°C/45 s, 66°C/30 s, 72°C/45 s – 36X 72°C/7 min	335	26
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F: 5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3' R: 5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	0,1	1,5	94°C/3 min 94°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/2,5 min – 40X 72°C/5 min	1024	27
<i>Prevotella intermedia</i>	F: 5'-TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG-3' R: 5'-TCAACATCTCTGTATCCTGCGT-3'	0,8	1,0	95°C/2 min 94°C/30s, 55°C/1 min, 72°C/2 min – 36X 72°C/10 min	575	3
<i>Prevotella nigrescens</i>	F: 5'-ATGAAACAAAGGTTTTCCGGTAAG-3' R: 5'-CCCACGTCTCTGTGGGCTGCGA-3'	0,8	1,0	95°C/2 min 94°C/30s, 55°C/1 min, 72°C/2 min – 36X 72°C/10 min	804	3
<i>Tannerella forsythia</i>	F: 5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3' R: 5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'	1,0	1,5	95°C/2 min 95°C/30s, 60°C/1 min, 72°C/1 min – 36X 72°C/2 min	641	3
<i>Treponema denticola</i>	F: 5'-TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT-3' R: 5'-TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA-3'	1,0	1,5	95°C/2 min 95°C/30s, 60°C/1 min, 72°C/1 min – 36X 72°C/2 min	316	3





rDNA 16S de eubactéria foi detectado em todas as amostras incluídas no estudo.

## 5.1 Prevalência de periodontopatógenos

Os resultados referentes à frequência dos periodontopatógenos em cada grupo de estudo encontram-se na TAB. 1. Entre os 237 indivíduos incluídos, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* foram detectados em 48,90%, 33,30%, 65,40%, 0,80%, 8,80%, 19,40% e 15,20%, respectivamente. *P. gingivalis* não foi detectada nas amostras estudadas.

No grupo de indivíduos antes da erupção dos dentes (grupo A), apenas *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foram identificados.

Nos grupos B e C (crianças com dentição decídua completa entre três e cinco anos de idade e crianças na faixa etária de sete a 10 anos), os microrganismos mais prevalentes foram *E. corrodens* (59,50%) e *F. nucleatum* (75,30%).

Nos adolescentes (grupo D), *F. nucleatum* foi detectado em cerca de 75% dos indivíduos.

Nos adultos (grupos E e F), *A. actinomycetemcomitans* (46,15%) e *F. nucleatum* (58,97%) foram os microrganismos mais frequentemente observados.

TABELA 1

Freqüência de detecção de periodontopatógenos em espécimes gengivais e subgengivais de indivíduos com periodonto saudável por PCR

Grupos	Periodontopatógenos						
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
A (14 <sup>a</sup> )	13 <sup>b</sup> (92,80 <sup>c</sup> )	0 (0,00)	4 (28,60)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
B (47)	27 (57,40)	30 (63,80)	34 (72,30)	0 (0,00)	4 (8,50)	14 (29,80)	7 (14,90)
C (42)	19 (45,20)	23 (54,80)	33 (78,60)	1 (2,40)	4 (9,50)	17 (36,20)	12 (28,60)
D (34)	14 (41,20)	9 (26,50)	26 (76,50)	0 (0,00)	6 (17,60)	5 (14,70)	6 (17,60)
E (20)	7 (35,00)	7 (35,00)	9 (45,00)	0 (0,00)	4 (20,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
F (19)	11 (57,90)	3 (15,80)	14 (73,70)	1 (5,30)	1 (5,30)	4 (21,00)	7 (36,80)
G (48)	19 (39,60)	2 (4,20)	27 (56,20)	0 (0,00)	1 (2,10)	2 (4,20)	3 (6,20)
H (13)	6 (46,10)	5 (38,50)	9 (69,20)	0 (0,00)	1 (7,70)	4 (30,80)	1 (7,70)
<b>TOTAL</b>	<b>116 (49,00)</b>	<b>79 (33,30)</b>	<b>155 (65,40)</b>	<b>2 (0,80)</b>	<b>21 (8,80)</b>	<b>46 (19,40)</b>	<b>36 (15,20)</b>

<sup>a</sup> número (n) de indivíduos incluídos no estudo, <sup>b</sup> indivíduos cujo resultado foi positivo, <sup>c</sup>: (%)

A: crianças antes da erupção dos dentes; B: crianças com dentição decídua completa (3 a 5 anos); C: crianças (7 a 10 anos); D: adolescentes (13 a 15 anos); E: adultos (20 a 45 anos); F: adultos (> 45 anos); G: adultos edêntulos sem prótese total; H: pacientes com implante dental

Nos indivíduos edêntulos (grupo G), *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foram identificados em frequência superior a 35% e *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* em menos de 10% dos mesmos.

*A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* foram detectados, respectivamente, em 46,10%, 38,50%, 69,20%, 7,70%, 30,80% e 7,70% dos indivíduos com implante dental (grupo H). *P. intermedia* não foi detectada.

## 5.2 Associações entre os grupos bacterianos

Considerando o total de amostras, observou-se: relação sinérgica entre *F. nucleatum* e (*T. forsythia*, *P. nigrescens*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*). Relações antagonistas entre *T. denticola* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*), *T. forsythia* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*), *P. intermedia* e (*E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) e entre *P. nigrescens* e (*T. forsythia*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*). Diversas relações antagonistas mútuas foram também observadas (TAB 2).

No grupo A, observou-se relação positiva apenas entre *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*. Relação negativa não foi observada entre as espécies bacterianas detectadas nos indivíduos deste grupo (TAB 3).

TABELA 2

Associações entre periodontopatógenos em espécimes clínicos obtidos de 237 indivíduos com periodonto saudável

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados						
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 0,79	1,27	1,00	1,11	0,69	0,70
<i>Eikenella corrodens</i>	0,65	-	0,90	1,00	0,73	1,28	0,94
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2,03	2,55	-	0,00	2,02	2,61	1,56
<i>Prevotella intermedia</i>	0,01	0,01	0,01	-	0,00	0,04	0,05
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,10	0,11	0,14	0,00	-	0,26	0,00
<i>Tanerella forsythia</i>	0,23	0,38	0,34	0,00	0,76	-	0,72
<i>Treponema denticola</i>	0,14	0,21	0,20	0,00	0,00	0,50	-

TABELA 3

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de crianças antes da erupção dos dentes (n = 14)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados	
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 3,02
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,60	-

<sup>a</sup>OR (Odds ratio)

No grupo B, identificou-se relação sinérgica mútua entre *F. nucleatum* e *E. corrodens*. Relações sinérgicas entre *F. nucleatum* e (*T. denticola*, *T. forsythia*, *P. nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans*) e entre *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia*. Relações antagonistas entre diversos periodontopatógenos foram observadas (TAB 4).

No grupo C, foram detectadas relações positivas entre *F. nucleatum* e (*T. denticola*, *T. forsythia*, *P. nigrescens*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) e entre *E. corrodens* e (*T. denticola*, *T. forsythia* e *F. nucleatum*). Relações antagonistas entre *T. denticola* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) e *P. nigrescens* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) foram identificadas. Relações negativas mútuas entre diferentes periodontopatógenos foram observadas (TAB 5).

No que se refere ao grupo D, relações positivas foram observadas entre *F. nucleatum* e (*T. forsythia*, *P. nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans*). Relações negativas mútuas foram observadas entre *T. denticola* e (*T. forsythia* e *P.*

TABELA 4

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de crianças com dentição decídua completa (grupo B/n = 47)

Periodontopatógenos Efetores	Periodontopatógenos associados					
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 1,69	1,67	2,00	2,19	1,00
<i>Eikenella corrodens</i>	1,90	-	2,43	1,00	1,30	1,00
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4,00	2,67	-	3,04	4,54	3,04
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,04	0,07	0,14	-	0,18	0,00
<i>Tanerella forsythia</i>	0,49	0,35	0,53	1,00	-	1,32
<i>Treponema denticola</i>	0,17	0,11	0,14	0,00	0,44	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

TABELA 5

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de crianças na faixa etária de 7 a 10 anos de idade (grupo C/n = 42)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados						
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 1,20	1,00	0,00	2,00	1,00	0,71
<i>Eikenella corrodens</i>	1,99	-	4,01	0,00	1,00	2,20	3,47
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3,35	5,35	-	0,00	3,08	3,01	2,50
<i>Prevotella intermedia</i>	0,00	0,04	0,05	-	0,00	0,06	0,09
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,12	0,09	0,18	0,00	-	0,33	0,00
<i>Tanerella forsythia</i>	0,72	0,91	0,82	0,00	0,00	-	1,00
<i>Treponema denticola</i>	0,36	0,44	0,33	0,00	0,00	0,50	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

*nigrescens*), entre *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* e entre *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*. Relações negativas foram identificadas entre *T. denticola* e (*F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*), entre *T. forsythia* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*), entre *P. nigrescens* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) e entre *E. corrodens* e (*F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*) (TAB 6).

No grupo E, relações sinérgicas mútuas foram detectadas apenas entre *F. nucleatum* e *E. corrodens*. Relações antagonistas mútuas entre *P. nigrescens* e *E. corrodens* e entre *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* foram observadas (TAB 7).

Em relação ao grupo F, relação positiva foi identificada entre *T. denticola* e *T. forsythia* e relação positiva mútua foi detectada entre *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*. Relações negativas mútuas entre *T. denticola* e (*P. intermedia* e *P. nigrescens*), *T. forsythia* e (*P. intermedia*, *P. nigrescens* e *E. corrodens*), *P. intermedia* e (*P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*), *P. nigrescens* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*), *F. nucleatum* e *E. corrodens* e entre *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* foram detectadas. Relações negativas foram observadas entre diversos microrganismos (TAB 8).

No grupo G, relações sinérgicas foram observadas entre *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*. Relações antagonistas mútuas foram identificadas entre *T. denticola* e *E. corrodens*, *T. forsythia* e *E. corrodens* e *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*. Relações antagonistas entre *T. denticola* e *F. nucleatum*, *T. forsythia* e *F. nucleatum* e *E. corrodens* e *F. nucleatum* foram observadas (TAB 9).



TABELA 6

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de adolescentes (grupo D/n = 34)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados					
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 0,33	0,58	0,50	0,25	0,67
<i>Eikenella corrodens</i>	0,17	-	0,19	0,50	0,67	1,00
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2,33	1,00	-	4,05	4,05	1,00
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,17	0,28	0,27	-	0,67	0,00
<i>Tanerella forsythia</i>	0,07	0,28	0,27	0,50	-	0,00
<i>Treponema denticola</i>	0,15	0,50	0,19	0,00	0,00	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

TABELA 7

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de adultos com idade entre 20 e 45 anos (n = 20)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados			
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 0,40	0,80	1,00
<i>Eikenella corrodens</i>	0,40	-	3,00	0,33
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2,00	6,00	-	1,00
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,40	0,16	0,12	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

TABELA 8

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de adultos com idade superior a 45 anos (grupo F/n = 19)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados						
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	0,00	<sup>a</sup> 5,95	0,00	0,00	1,00	0,75
<i>Eikenella corrodens</i>	0,33	-	0,40	0,00	0,00	0,00	0,17
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3,00	0,19	-	0,00	0,00	1,98	1,33
<i>Prevotella intermedia</i>	0,09	0,00	0,16	-	0,00	0,33	0,17
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,10	0,00	0,00	0,00	-	0,33	0,00
<i>Tanerella forsythia</i>	0,20	0,00	0,40	0,00	0,00	-	0,75
<i>Treponema denticola</i>	0,33	0,50	1,33	0,00	0,00	2,98	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

TABELA 9

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de edêntulos (grupo G/n = 48)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados				
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 0,12	2,25	0,50	0,50
<i>Eikenella corrodens</i>	0,10	-	0,08	0,00	0,00
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,80	1,00	-	1,00	0,50
<i>Tanerella forsythia</i>	0,05	0,00	0,08	-	2,00
<i>Treponema denticola</i>	0,05	0,00	0,08	0,00	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

Relativo ao grupo H, relação positiva foi observada entre *A. actinomycetemcomitans* e *E. corrodens*. Relações negativas mútuas foram observadas entre *T. denticola* e (*T. forsythia*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*), entre *T. forsythia* e (*P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) e entre *P. nigrescens* e (*F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*) (TAB 10).

TABELA 10

Associações entre periodontopatógenos detectadas no grupo de pacientes com implante dental (grupo H/n = 13)

Periodontopatógenos efetores	Periodontopatógenos associados					
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Tanerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	<sup>a</sup> 3,99	0,80	0	0,33	0
<i>Eikenella corrodens</i>	2,00	-	1,25	0	0,34	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,49	0,67	-	0	0,49	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,20	0,25	0	-	0	0
<i>Tanerella forsythia</i>	0,20	0,25	0,33	0	-	0
<i>Treponema denticola</i>	0	0	0,33	0	0	-

<sup>a</sup> OR (Odds ratio)

A microbiota indígena não apresenta relação passiva com seu hospedeiro. De fato, esta comunidade microbiana contribui, direta e indiretamente, para o desenvolvimento morfofuncional e do sistema de defesa do indivíduo, bem como para a nutrição do mesmo, por meio da síntese e metabolismo de numerosas substâncias (MARSH, 2003). Além disto, constitui importante reservatório de microrganismos potencialmente patogênicos que podem ser responsáveis por processos infecciosos em diversas regiões do organismo (FINEGOLD et al., 1993; MARSH & MARTIN, 1992; MCNABB & TOMASI, 1981; SAVAGE, 1977). Na cavidade oral, a microbiota está associada com a etiologia de duas doenças infecciosas extremamente comuns em seres humanos, a cárie e a doença periodontal, que se desenvolvem como resultado da ruptura do equilíbrio entre microbiota e hospedeiro (MARSH, 2003).

Acredita-se que mais de 700 espécies bacterianas estão presentes na cavidade oral de seres humanos (AAS et al., 2005; PEREA, 2004; SAKAMOTO et al., 2005). Algumas delas foram organizadas, por Socransky et al. (1998), em complexos, de acordo com sua associação com a doença periodontal, numa tentativa de facilitar a compreensão da relação destes microrganismos com a etiopatogenia da doença e da evolução da mesma. Entre eles, o complexo verde (*Capnocytophaga* spp., *C. concisus*, *E. nodatum* e *S. constellatus*) e o complexo amarelo (*Streptococcus* spp.) não estão associados com doenças periodontais. O complexo púrpura (*A. odontolyticus* e *V. parvula*) está associado ao sangramento à sondagem e relacionado com os complexos laranja (*F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. micros*) e vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*), fortemente associados com doença periodontal (FENG & WEINBERG, 2006).

A maior parte do conhecimento referente à composição da microbiota oral advém de estudos que empregaram métodos dependentes de cultura. Tais métodos apresentam várias limitações, como execução laboriosa, obtenção demorada de resultados e sensibilidade baixa, especialmente por se tratar de microbiota  
5 extremamente rica e diversificada. Além disto, muitos membros desta comunidade microbiana são fastidiosos, o que também dificulta seu isolamento. Por estas razões, entre outras, admite-se que apenas cerca de 50% dos organismos constituintes da microbiota oral tenham sido, até o momento, isolados em meios de cultura artificiais e, portanto, sejam passíveis de caracterização fenotípica (AAS et al., 2005;  
10 SIQUEIRA Jr & RÔÇAS, 2005).

Após o advento dos métodos de genética molecular aplicados ao diagnóstico, o conhecimento da composição da microbiota e de seu papel na etiopatogenia das doenças vem aumentando de forma exponencial. Entre eles, o mais empregado é a PCR, uma técnica de execução rápida que apresenta  
15 sensibilidade e especificidade elevadas. Entretanto, a PCR convencional não permite a diferenciação entre microrganismos viáveis e inviáveis e é uma técnica qualitativa. Esta limitação vem sendo suplantada pelo emprego de uma variação da técnica, a PCR em tempo real, ainda extremamente dispendiosa e disponível em poucos laboratórios brasileiros. Diversos estudos, realizados principalmente na  
20 última década, envolvendo a comparação de resultados de PCR com o método microbiológico convencional, permitiram concluir, em sua maioria, que a PCR é um método mais acurado para detecção de microrganismos da cavidade oral, incluindo aqueles que nunca foram ou são dificilmente isolados em meios de cultura artificiais (FLEMMIG et al., 1995; RIGGIO et al., 1996; SAKAMOTO et al., 2005).



Empregando amostras obtidas de placa subgengival, Avila-Campos et al. (2002) detectaram, por PCR, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em 70,0%, 92,0%, 66,0% e 64,0% dos indivíduos, de 18 a 51 anos de idade, com periodonto saudável. Resultado de estudo semelhante, também empregando PCR, desenvolvido em 2004 por Mayanagi et al., demonstrou que *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* estavam presentes, respectivamente, em amostras subgengivais de aproximadamente 41,0%, 87,0%, 100%, 18,0%, 70,0%, 70,0% e 23,0% dos indivíduos de 22 a 29 anos com periodonto saudável. Vale ressaltar que *P. gingivalis* não foi detectada nos indivíduos estudados. Investigando, por hibridização DNA-DNA, a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*, também em amostras de placa subgengival de indivíduos de 16 a 48 anos sem lesão periodontal, Ximénez-Fyvie et al. (2000) detectaram os organismos em aproximadamente 8,0%, 25,0%, 50,0%, 7,0%, 18,0%, 25,0%, 10,0% e 17,0% dos pacientes estudados, respectivamente.

No presente estudo, foram identificados *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* em aproximadamente 50%, 30%, 70%, 1%, 10%, 20% e 15% dos indivíduos estudados, respectivamente. De fato, diversos pesquisadores têm observado a existência de associação entre *P. gingivalis* e doença, entre eles Mayanagi et al. (2004) e Ximénez-Fyvie et al. (2000), que detectaram o microrganismo em mais de 40% das amostras de pacientes com periodontite. Além disso, Ximénez-Fyvie et al. (2000) sugerem que outros microrganismos, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*, apresentam relação estreita

com a presença de periodontite, uma vez que estas espécies foram detectadas em taxas muito maiores nos indivíduos doentes do que naqueles com o periodonto saudável.

*F. nucleatum* tem papel importante na formação do biofilme dental e tem  
5 ação positiva sobre várias espécies, auxiliando na fixação e, em consequência, multiplicação das mesmas (SHARMA et al., 2005). Esta possível função do microrganismo pode explicar o índice elevado de detecção do mesmo na cavidade oral, em especial na microbiota gengival e subgengival, como demonstrado nos estudos de Mayanagi et al. (2004) e Ximénez-Fyvie et al. (2000) e observado na  
10 presente investigação.

Estudos desenvolvidos na última década do século passado buscaram caracterizar a microbiota de crianças sem lesões aparentes na cavidade oral. Assim, Kononen et al. (1992), pesquisando anaeróbios Gram negativos em crianças de um a sete meses de idade, antes da erupção dos dentes, por métodos dependentes de  
15 cultura, detectaram *F. nucleatum* em mais de 50% dos casos e *E. corrodens* e *P. intermedia* em apenas cerca de 3% e 7% dos indivíduos estudados, respectivamente. Os autores, entretanto, não identificaram *A. actinomycetemcomitans* nas amostras estudadas. Em 1994, Kononen et al. investigaram os mesmos microrganismos em amostras de 21 crianças em dois  
20 momentos distintos, aos três e aos 32 meses de idade, também empregando o método cultura-dependente. Os autores observaram aumento na frequência de isolamento de *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *E. corrodens* com a idade: de cerca de 70% para 100%, 10% para 70% e 5% para 60%, respectivamente. Diferentemente, no presente estudo, o grupo de crianças antes da erupção dos dentes apresentou  
25 apenas *F. nucleatum* (28,60%) e *A. actinomycetemcomitans* (92,80%), o que indica

que a ausência dos dentes limita a diversidade de bactérias capazes de colonizar a cavidade oral.

A erupção dos dentes altera o ambiente da cavidade oral proporcionando aumento de sítios para a colonização bacteriana. Kamma et al. (2000) isolaram 41 espécies de amostras subgingivais obtidas da cavidade oral de crianças com periodonto saudável, com idade entre quatro e cinco anos, empregando cultura para detecção bacteriana e testes bioquímicos para sua identificação. *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia* foram identificadas em amostras de 44,20%, 39,10%, 8,30%, 55,00% e 1,30% das crianças, respectivamente. No presente estudo, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *T. forsythia* foram detectadas em amostras obtidas de, respectivamente, 63,80%, 72,30% e 29,80% das crianças com idade entre três e cinco anos e *P. gingivalis* e *P. intermedia* não foram identificadas no nosso grupo de estudo. Por outro lado, *P. nigrescens* foi identificada em apenas 8,5% dos indivíduos. Exceto para *P. gingivalis* e *P. intermedia*, as taxas de detecção dos microrganismos observadas no presente estudo foram superiores às relatadas por Kamma et al. (2000), o que pode estar relacionado à maior sensibilidade do método genético. No que se refere a *P. gingivalis*, deve ser ressaltado que, na nossa investigação, o microrganismo não foi identificado nos indivíduos estudados, independente de faixa etária, ao contrário de resultados descritos por outros autores (KAMMA et al., 2000; SAKAI, 2005; VAN WINKELHOFF et al., 2002). Uma explicação plausível é que o microrganismo realmente não seja membro da microbiota indígena, colonizando a cavidade oral apenas nos estados de ruptura do equilíbrio entre microbiota e hospedeiro. É, ainda, possível admitir a existência de diferenças regionais na microbiota indígena da cavidade oral ou que as amostras de *P. gingivalis* não tenham sido detectadas pelo método empregado no presente

estudo devido a mutações na região de anelamento dos *primers* utilizados. Relativo a *P. intermedia*, deve ser destacado que a diferenciação entre a espécie e *P. nigrescens* pelos métodos microbiológicos tradicionais (cultura e identificação bioquímico-fisiológica) é extremamente difícil. Este fato justificaria a identificação de *P. intermedia* pelos autores e a observação de *P. nigrescens* na nossa investigação. Entretanto, não justifica a baixa proporção de *Prevotella* detectada. É possível que as condições de reação empregadas neste estudo tenham sido muito restritivas, induzindo a resultados negativos falsos, ou que o método de identificação utilizado por Kamma et al. (2000) não tenha sido suficientemente específico para *P. intermedia*.

Sakai (2005), pesquisando *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens* e *T. denticola* na saliva de crianças de oito a 10 anos de idade, identificou os microrganismos, por PCR, em aproximadamente 4,7%, 6,3%, 23,4% e 71,9% das amostras, respectivamente. Os resultados observados no presente estudo foram diferentes daqueles relatados pela autora. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 45,20% e os demais microrganismos foram observados em baixa frequência; como já referido, *P. gingivalis* não foi identificada no nosso grupo de estudo. Deve ser ressaltado que a autora observou *F. nucleatum* em 78,60% dos indivíduos estudados, resultado semelhante ao observado na presente investigação e que demonstra que o microrganismo está presente na microbiota oral da maioria dos indivíduos, sem relação com a idade dos mesmos. É importante lembrar que a autora investigou a microbiota da saliva, o que pode explicar as diferenças detectadas: na placa subgengival são observados microrganismos aderidos, do biofilme placa dental, enquanto na saliva são observados muitos microrganismos transitórios, inclusive células procariontas da microbiota gengival/subgengival e de

outros sítios da cavidade oral. No que se refere a *F. nucleatum*, nossos resultados e aqueles apresentados por Sakai (2005) confirmam a presença difusa do organismo em diferentes sítios da cavidade oral.

Alterações fisiológicas observadas na puberdade parecem influenciar a microbiota indígena de diferentes regiões do organismo, inclusive a microbiota periodontal. Deve ser ainda salientado que, nesta fase da vida, parece haver aumento da suscetibilidade a processos inflamatórios da cavidade oral, uma vez que, nesta ocasião, observa-se um pico na frequência de gengivites mais graves. É possível que estas alterações estejam relacionadas com aumento da produção de hormônios sexuais e suas conseqüências globais sobre o organismo. Assim, alguns estudos demonstram grande aumento da proporção de vários microrganismos entre os quais podem ser citados *P. intermedia*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* (DARBY & CURTIS, 2001). Quando comparado com o grupo de crianças com sete a 10 anos de idade, observou-se maior frequência apenas de *P. nigrescens*, enquanto os outros microrganismos foram detectados em taxas ligeiramente inferiores. Por outro lado, quando a comparação foi feita com o grupo etário imediatamente superior (indivíduos de 20 a 45 anos), vários microrganismos foram mais prevalentes na microbiota gengival/subgengival dos adolescentes. De fato, a relação idade x microbiota oral na pós-puberdade é ainda pouco compreendida (DARBY & CURTIS, 2001). Deve ser ressaltado, entretanto, que as alterações da microbiota gengival/subgengival na adolescência podem explicar a maior suscetibilidade às doenças periodontais, como anteriormente mencionado.

Nesta investigação, o grupo de indivíduos com idade entre 20 e 45 anos apresentou apenas quatro microrganismos: *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Mayanagi et al. (2004) e Ximénez-Fyvie et

al. (2000) observaram uma diversidade maior de espécies bacterianas nos indivíduos com periodonto saudável desta faixa etária, estudando amostras de placa subgingival, por PCR. Considerando que os espécimes incluídos no presente estudo foram processados juntos, sem separação por grupo, pode-se sugerir que os dados obtidos para este grupo de indivíduos são igualmente confiáveis, embora um resultado tão divergente tenha sido observado. Características intrínsecas do grupo de estudo ou variações metodológicas entre diferentes estudos podem explicar as diferenças observadas.

Em indivíduos com mais de 45 anos de idade com periodonto sadio, van Winkelhoff et al. (2002) identificaram, empregando o método cultura-dependente, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em cerca de 50%, 70%, 10%, 90% e 10% das amostras de placa supra-gingival analisadas, respectivamente. No presente estudo, tais microrganismos foram detectados em cerca de 20%, 5%, 70%, 60% e 0% dos espécimes clínicos, respectivamente. *P. nigrescens* foi identificada em cerca de 5% dos espécimes clínicos estudados. Deve-se lembrar da dificuldade de diferenciação entre *P. intermedia/nigrescens* por cultura, o que pode explicar a taxa de detecção de *P. intermedia* de cerca de 70% relatada pelos autores.

A ausência dos dentes diminui a variedade de sítios para colonização bacteriana na cavidade oral. Os indivíduos edêntulos incluídos neste estudo apresentaram proporção menor de microrganismos, sendo mais frequentes *F. nucleatum* (cerca de 60%) e *A. actinomycetemcomitans* (cerca de 40%), não tendo sido observados *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Devides & Franco (2006) pesquisaram, por PCR, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* em pacientes edêntulos antes da colocação de implante mandibular e detectaram os

referidos organismos em aproximadamente 10%, 50% e em nenhuma das amostras analisadas, respectivamente. As diferenças observadas podem estar relacionadas ao desenho dos *primers* empregados nos dois estudos, o que leva a variações tanto na sensibilidade como na especificidade do teste laboratorial utilizado. Na ausência dos dentes, seja antes de sua erupção ou após a perda do elemento dental, os microrganismos mais prevalentes foram *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, o que demonstra a capacidade de adesão à superfície epitelial gengival apresentada por estas bactérias.

O implante dental, possivelmente devido à criação de um *habitat* semelhante à região periodontal natural, acarretou aumento na diversidade de microrganismos detectados, quando os resultados foram comparados com aqueles do grupo de edêntulos. De forma semelhante, *P. intermedia* e *P. gingivalis* não foram observados nas amostras clínicas obtidas dos dois grupos de indivíduos. Hultin et al. (2002), utilizando hibridização DNA-DNA e amostras de fluido do sulco gengival de pacientes com implantes dentários, observaram índice elevado de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola*. Os autores concluíram que há uma colonização bacteriana específica de acordo com o tipo e o tempo do implante. Já no presente estudo, os microrganismos mais prevalentes foram *F. nucleatum* (69,20%), *A. actinomycetemcomitans* (46,10%), *E. corrodens* (38,50%) e *T. forsythia* (30,80%). Estas variações, possivelmente, ocorreram por diferenças entre as metodologias empregadas e entre os tipos e tempo de uso dos implantes.

Diversos autores têm descrito a existência de relações sinérgicas e/ou antagonistas entre os microrganismos que constituem a microbiota da cavidade oral. A formação e a manutenção do biofilme dental baseia-se nas relações entre a

grande variedade de espécies bacterianas aí presentes e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (DAVEY & COSTERTON, 2006). É a manutenção do equilíbrio entre os constituintes do biofilme e com o hospedeiro que resultará em estado de saúde da região periodontal do indivíduo. Por estas razões, o conhecimento da microbiota do sítio e a compreensão das relações positivas ou negativas existentes entre os diferentes microrganismos presentes naquele *habitat* possibilitarão o esclarecimento do papel dos mesmos como promotores de saúde ou como agentes de doença e, em última análise, a utilização deste conhecimento para prevenção das doenças periodontais.

10 Ali et al. (1994), empregando sondas de DNA e espécimes clínicos de pacientes com periodontite, observaram associações positivas mútuas entre *F. nucleatum*/*T. forsythia*/*P. gingivalis* e concluíram que a presença de *P. intermedia* não influencia a colonização pelas espécies bacterianas anteriormente mencionadas (*F. nucleatum*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*). Ashimoto et al. (1996), estudando, por PCR, amostras de placa gengival/subgengival de pacientes com periodontite ou gengivite, observaram diversas associações positivas, por exemplo, entre *T. forsythia*/*T. denticola*, *T. forsythia*/*P. gingivalis*, *P. intermedia*/*T. denticola*, *P. gingivalis*/*P. intermedia*, *T. forsythia*/*P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*/*P. nigrescens*, *T. forsythia*/*P. nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans*/*T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*/*P. gingivalis*, *P. gingivalis*/*T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*/*T. denticola* e *P. gingivalis*/*P. nigrescens* com OR variando entre 2,75 e 14,60. Lana (2005) detectou, utilizando PCR, relações negativas entre *P. nigrescens*/*P. intermedia*, *T. denticola*/*T. forsythia* e *P. intermedia*/*T. denticola*, em pacientes com periodontite crônica. No grupo de pacientes com periodontite agressiva, a autora identificou relações positivas entre *T. forsythia*/*E. corrodens*, *E.*



*corrodens/T. denticola*, *P. intermedia/E. corrodens*, *P. nigrescens/Fusobacterium* spp., *T. forsythia/Fusobacterium* spp. e *T. forsythia/T. denticola* e relação negativa entre *T. denticola/T. forsythia*. Nos indivíduos com periodonto saudável, observou apenas relação positiva entre *T. denticola/E. corrodens*. *A. actinomycetemcomitans*,  
5 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola* são apontados por diferentes autores (AVILA-CAMPOS et al., 2002; ASHIMOTO et al., 1996; DARBY & CURTIS, 2001; LIEBANA et al., 2004; SAKAMOTO et al.; 2005; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005) como microrganismos fortemente relacionados à etiopatogenia da periodontite, seja isoladamente ou em associação. É possível que esta seja a razão  
10 para os resultados acima mencionados, observados por Ali et al. (1994), Ashimoto et al. (1996) e por Lana (2005), para os pacientes com periodontite.

Considerando-se o total de amostras analisadas no presente estudo, foram detectadas relações sinérgicas entre *F. nucleatum* e diversos microrganismos (TAB. 2). Relações antagonistas mútuas entre *T. denticola/P. intermedia/P.nigrescens*, *T. forsythia/P. intermedia*, *P. intermedia/F. nucleatum* e antagonistas entre *T. denticola/F. nucleatum*, *T. denticola/E. corrodens*, *T. denticola/A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia/F. nucleatum*, *T. forsythia/E. corrodens*, *T. forsythia/A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia/E.corrodens*, *P. intermedia/A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens/T. forsythia*, *P. nigrescens/F. nucleatum*, *P. nigrescens/E.corrodens* e *P. nigrescens/A. actinomycetemcomitans*  
15 (TAB. 2).

À semelhança do resultado desta investigação, relação positiva entre *F. nucleatum/T. forsythia* também foi observada por Ali et al. (1994) em pacientes com periodontite, o que pode indicar que não apenas a relação entre os microrganismos,  
20 mas, principalmente, a proporção de cada um na relação é fator determinante da

saúde ou doença. Por outro lado, Ashimoto et al. (1996), empregando amostras de pacientes com periodontite/gengivite, detectaram relações positivas entre *P. intermedia*/*T. denticola* e *T. forsythia*/*P. intermedia*, diferentemente dos dados obtidos na presente investigação. De forma semelhante, Lana (2005) relatou a  
5 ocorrência de relação sinérgica entre *P. intermedia*/*T. denticola* em pacientes com periodontite crônica. Estes resultados indicam que o tipo de relação entre os integrantes da microbiota da cavidade oral o que determina, em última análise, sua constituição, pode ser diferente nos estados de saúde ou de doença. Relação positiva entre *T. denticola*/*E. corrodens* foi descrita por Lana (2005), para o grupo de  
10 indivíduos com periodonto saudável. Diferentemente, no presente estudo, relação antagonista entre os dois grupos microbianos foi observada.

*F. nucleatum* é considerado um microrganismo chave na formação do biofilme dental, interagindo positivamente com várias espécies e permitindo a colonização pelas mesmas por meio, provavelmente, da produção de mediadores de  
15 co-agregação. O microrganismo modifica o ambiente tornando-o adequado para a implantação e manutenção de organismos anaeróbios estritos (SHARMA et al., 2005). Esta suposição é ratificada pelos resultados da presente investigação: *F. nucleatum* exerce influência positiva sobre quatro das sete espécies estudadas (*A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. nigrescens* e *T. forsythia*) e não exerce  
20 influência negativa sobre nenhuma delas.

Analisando os dados citados anteriormente, nota-se que o método empregado para análise da microbiota da cavidade oral determina a “qualidade” dos resultados obtidos. A PCR, método escolhido neste estudo, tem sido amplamente utilizada para a detecção de microrganismos orais, com a conclusão de que é mais  
25 acurada do que os métodos microbiológicas tradicionais, como dito anteriormente.

Porém, deve-se salientar o fato de que todos os métodos são executados, no todo ou em parte, manualmente, o que aumenta o risco de erros e/ou contaminação. No caso da PCR não é diferente; uma amostra contaminada durante o procedimento pode levar a um resultado falso-positivo, por exemplo. Além disto, dois fatores

5 críticos podem interferir na eficiência da reação: temperatura de anelamento e concentração de magnésio. Altas temperaturas de anelamento e baixas concentrações de magnésio reduzem a sensibilidade do método, dificultando a detecção dos organismos. Por outro lado, baixas temperaturas de anelamento e altas concentrações de magnésio aumentam a sensibilidade de detecção, mas

10 diminuem a especificidade, o que pode resultar em reações cruzadas com formação de bandas inespecíficas. Portanto, padronizar as condições ideais de reação é fundamental para o bom funcionamento do método (ASHIMOTO et al., 1996). Com a padronização correta, a PCR se apresentou mais específica e sensível, quando, por exemplo, permitiu a distinção entre *P. intermedia* e *P. nigrescens*.

15 O aperfeiçoamento dos testes utilizados na detecção dos integrantes da microbiota da cavidade oral, principalmente dos organismos apontados como periodontopatógenos, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção da cárie e da doença periodontal. Assim, métodos mais rápidos e acurados, como a PCR, poderão contribuir significativamente para este objetivo,

20 possibilitando a detecção de espécies orais ainda desconhecidas, o entendimento das relações entre os membros da microbiota oral e o papel de cada um na etiopatogenia das doenças da cavidade oral.



A microbiota indígena não apresenta relação passiva com seu hospedeiro. De fato, esta comunidade microbiana contribui, direta e indiretamente, para o desenvolvimento morfofuncional e do sistema de defesa do indivíduo, bem como para a nutrição do mesmo, por meio da síntese e metabolismo de numerosas substâncias (MARSH, 2003). Além disto, constitui importante reservatório de microrganismos potencialmente patogênicos que podem ser responsáveis por processos infecciosos em diversas regiões do organismo (FINEGOLD et al., 1993; MARSH & MARTIN, 1992; MCNABB & TOMASI, 1981; SAVAGE, 1977). Na cavidade oral, a microbiota está associada com a etiologia de duas doenças infecciosas extremamente comuns em seres humanos, a cárie e a doença periodontal, que se desenvolvem como resultado da ruptura do equilíbrio entre microbiota e hospedeiro (MARSH, 2003).

Acredita-se que mais de 700 espécies bacterianas estão presentes na cavidade oral de seres humanos (AAS et al., 2005; PEREA, 2004; SAKAMOTO et al., 2005). Algumas delas foram organizadas, por Socransky et al. (1998), em complexos, de acordo com sua associação com a doença periodontal, numa tentativa de facilitar a compreensão da relação destes microrganismos com a etiopatogenia da doença e da evolução da mesma. Entre eles, o complexo verde (*Capnocytophaga* spp., *C. concisus*, *E. nodatum* e *S. constellatus*) e o complexo amarelo (*Streptococcus* spp.) não estão associados com doenças periodontais. O complexo púrpura (*A. odontolyticus* e *V. parvula*) está associado ao sangramento à sondagem e relacionado com os complexos laranja (*F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. micros*) e vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*), fortemente associados com doença periodontal (FENG & WEINBERG, 2006).

A maior parte do conhecimento referente à composição da microbiota oral advém de estudos que empregaram métodos dependentes de cultura. Tais métodos apresentam várias limitações, como execução laboriosa, obtenção demorada de resultados e sensibilidade baixa, especialmente por se tratar de microbiota extremamente rica e diversificada. Além disto, muitos membros desta comunidade microbiana são fastidiosos, o que também dificulta seu isolamento. Por estas razões, entre outras, admite-se que apenas cerca de 50% dos organismos constituintes da microbiota oral tenham sido, até o momento, isolados em meios de cultura artificiais e, portanto, sejam passíveis de caracterização fenotípica (AAS et al., 2005; SIQUEIRA Jr & RÔÇAS, 2005).

Após o advento dos métodos de genética molecular aplicados ao diagnóstico, o conhecimento da composição da microbiota e de seu papel na etiopatogenia das doenças vem aumentando de forma exponencial. Entre eles, o mais empregado é a PCR, uma técnica de execução rápida que apresenta sensibilidade e especificidade elevadas. Entretanto, a PCR convencional não permite a diferenciação entre microrganismos viáveis e inviáveis e é uma técnica qualitativa. Esta limitação vem sendo suplantada pelo emprego de uma variação da técnica, a PCR em tempo real, ainda extremamente dispendiosa e disponível em poucos laboratórios brasileiros. Diversos estudos, realizados principalmente na última década, envolvendo a comparação de resultados de PCR com o método microbiológico convencional, permitiram concluir, em sua maioria, que a PCR é um método mais acurado para detecção de microrganismos da cavidade oral, incluindo aqueles que nunca foram ou são dificilmente isolados em meios de cultura artificiais (FLEMMIG et al., 1995; RIGGIO et al., 1996; SAKAMOTO et al., 2005).

Empregando amostras obtidas de placa subgengival, Avila-Campos et al. (2002) detectaram, por PCR, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em 70,0%, 92,0%, 66,0% e 64,0% dos indivíduos, de 18 a 51 anos de idade, com periodonto saudável. Resultado de estudo semelhante, também empregando PCR, desenvolvido em 2004 por Mayanagi et al., demonstrou que *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* estavam presentes, respectivamente, em amostras subgengivais de aproximadamente 41,0%, 87,0%, 100%, 18,0%, 70,0%, 70,0% e 23,0% dos indivíduos de 22 a 29 anos com periodonto saudável. Vale ressaltar que *P. gingivalis* não foi detectada nos indivíduos estudados. Investigando, por hibridização DNA-DNA, a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*, também em amostras de placa subgengival de indivíduos de 16 a 48 anos sem lesão periodontal, Ximénez-Fyvie et al. (2000) detectaram os organismos em aproximadamente 8,0%, 25,0%, 50,0%, 7,0%, 18,0%, 25,0%, 10,0% e 17,0% dos pacientes estudados, respectivamente.

No presente estudo, foram identificados *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola* em aproximadamente 50%, 30%, 70%, 1%, 10%, 20% e 15% dos indivíduos estudados, respectivamente. De fato, diversos pesquisadores têm observado a existência de associação entre *P. gingivalis* e doença, entre eles Mayanagi et al. (2004) e Ximénez-Fyvie et al. (2000), que detectaram o microrganismo em mais de 40% das amostras de pacientes com periodontite. Além disso, Ximénez-Fyvie et al. (2000) sugerem que outros microrganismos, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *T. denticola*, apresentam relação estreita

com a presença de periodontite, uma vez que estas espécies foram detectadas em taxas muito maiores nos indivíduos doentes do que naqueles com o periodonto saudável.

*F. nucleatum* tem papel importante na formação do biofilme dental e tem  
5 ação positiva sobre várias espécies, auxiliando na fixação e, em consequência, multiplicação das mesmas (SHARMA et al., 2005). Esta possível função do microrganismo pode explicar o índice elevado de detecção do mesmo na cavidade oral, em especial na microbiota gengival e subgengival, como demonstrado nos estudos de Mayanagi et al. (2004) e Ximénez-Fyvie et al. (2000) e observado na  
10 presente investigação.

Estudos desenvolvidos na última década do século passado buscaram caracterizar a microbiota de crianças sem lesões aparentes na cavidade oral. Assim, Kononen et al. (1992), pesquisando anaeróbios Gram negativos em crianças de um a sete meses de idade, antes da erupção dos dentes, por métodos dependentes de  
15 cultura, detectaram *F. nucleatum* em mais de 50% dos casos e *E. corrodens* e *P. intermedia* em apenas cerca de 3% e 7% dos indivíduos estudados, respectivamente. Os autores, entretanto, não identificaram *A. actinomycetemcomitans* nas amostras estudadas. Em 1994, Kononen et al. investigaram os mesmos microrganismos em amostras de 21 crianças em dois  
20 momentos distintos, aos três e aos 32 meses de idade, também empregando o método cultura-dependente. Os autores observaram aumento na frequência de isolamento de *F. nucleatum*, *P. intermedia* e *E. corrodens* com a idade: de cerca de 70% para 100%, 10% para 70% e 5% para 60%, respectivamente. Diferentemente, no presente estudo, o grupo de crianças antes da erupção dos dentes apresentou  
25 apenas *F. nucleatum* (28,60%) e *A. actinomycetemcomitans* (92,80%), o que indica



que a ausência dos dentes limita a diversidade de bactérias capazes de colonizar a cavidade oral.

A erupção dos dentes altera o ambiente da cavidade oral proporcionando aumento de sítios para a colonização bacteriana. Kamma et al. (2000) isolaram 41 espécies de amostras subgingivais obtidas da cavidade oral de crianças com periodonto saudável, com idade entre quatro e cinco anos, empregando cultura para detecção bacteriana e testes bioquímicos para sua identificação. *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia* foram identificadas em amostras de 44,20%, 39,10%, 8,30%, 55,00% e 1,30% das crianças, respectivamente. No presente estudo, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *T. forsythia* foram detectadas em amostras obtidas de, respectivamente, 63,80%, 72,30% e 29,80% das crianças com idade entre três e cinco anos e *P. gingivalis* e *P. intermedia* não foram identificadas no nosso grupo de estudo. Por outro lado, *P. nigrescens* foi identificada em apenas 8,5% dos indivíduos. Exceto para *P. gingivalis* e *P. intermedia*, as taxas de detecção dos microrganismos observadas no presente estudo foram superiores às relatadas por Kamma et al. (2000), o que pode estar relacionado à maior sensibilidade do método genético. No que se refere a *P. gingivalis*, deve ser ressaltado que, na nossa investigação, o microrganismo não foi identificado nos indivíduos estudados, independente de faixa etária, ao contrário de resultados descritos por outros autores (KAMMA et al., 2000; SAKAI, 2005; VAN WINKELHOFF et al., 2002). Uma explicação plausível é que o microrganismo realmente não seja membro da microbiota indígena, colonizando a cavidade oral apenas nos estados de ruptura do equilíbrio entre microbiota e hospedeiro. É, ainda, possível admitir a existência de diferenças regionais na microbiota indígena da cavidade oral ou que as amostras de *P. gingivalis* não tenham sido detectadas pelo método empregado no presente

estudo devido a mutações na região de anelamento dos *primers* utilizados. Relativo a *P. intermedia*, deve ser destacado que a diferenciação entre a espécie e *P. nigrescens* pelos métodos microbiológicos tradicionais (cultura e identificação bioquímico-fisiológica) é extremamente difícil. Este fato justificaria a identificação de *P. intermedia* pelos autores e a observação de *P. nigrescens* na nossa investigação. Entretanto, não justifica a baixa proporção de *Prevotella* detectada. É possível que as condições de reação empregadas neste estudo tenham sido muito restritivas, induzindo a resultados negativos falsos, ou que o método de identificação utilizado por Kamma et al. (2000) não tenha sido suficientemente específico para *P. intermedia*.

Sakai (2005), pesquisando *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens* e *T. denticola* na saliva de crianças de oito a 10 anos de idade, identificou os microrganismos, por PCR, em aproximadamente 4,7%, 6,3%, 23,4% e 71,9% das amostras, respectivamente. Os resultados observados no presente estudo foram diferentes daqueles relatados pela autora. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 45,20% e os demais microrganismos foram observados em baixa frequência; como já referido, *P. gingivalis* não foi identificada no nosso grupo de estudo. Deve ser ressaltado que a autora observou *F. nucleatum* em 78,60% dos indivíduos estudados, resultado semelhante ao observado na presente investigação e que demonstra que o microrganismo está presente na microbiota oral da maioria dos indivíduos, sem relação com a idade dos mesmos. É importante lembrar que a autora investigou a microbiota da saliva, o que pode explicar as diferenças detectadas: na placa subgengival são observados microrganismos aderidos, do biofilme placa dental, enquanto na saliva são observados muitos microrganismos transitórios, inclusive células procariontas da microbiota gengival/subgengival e de

outros sítios da cavidade oral. No que se refere a *F. nucleatum*, nossos resultados e aqueles apresentados por Sakai (2005) confirmam a presença difusa do organismo em diferentes sítios da cavidade oral.

Alterações fisiológicas observadas na puberdade parecem influenciar a microbiota indígena de diferentes regiões do organismo, inclusive a microbiota periodontal. Deve ser ainda salientado que, nesta fase da vida, parece haver aumento da suscetibilidade a processos inflamatórios da cavidade oral, uma vez que, nesta ocasião, observa-se um pico na frequência de gengivites mais graves. É possível que estas alterações estejam relacionadas com aumento da produção de hormônios sexuais e suas conseqüências globais sobre o organismo. Assim, alguns estudos demonstram grande aumento da proporção de vários microrganismos entre os quais podem ser citados *P. intermedia*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* (DARBY & CURTIS, 2001). Quando comparado com o grupo de crianças com sete a 10 anos de idade, observou-se maior frequência apenas de *P. nigrescens*, enquanto os outros microrganismos foram detectados em taxas ligeiramente inferiores. Por outro lado, quando a comparação foi feita com o grupo etário imediatamente superior (indivíduos de 20 a 45 anos), vários microrganismos foram mais prevalentes na microbiota gengival/subgengival dos adolescentes. De fato, a relação idade x microbiota oral na pós-puberdade é ainda pouco compreendida (DARBY & CURTIS, 2001). Deve ser ressaltado, entretanto, que as alterações da microbiota gengival/subgengival na adolescência podem explicar a maior suscetibilidade às doenças periodontais, como anteriormente mencionado.

Nesta investigação, o grupo de indivíduos com idade entre 20 e 45 anos apresentou apenas quatro microrganismos: *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Mayanagi et al. (2004) e Ximénez-Fyvie et

al. (2000) observaram uma diversidade maior de espécies bacterianas nos indivíduos com periodonto saudável desta faixa etária, estudando amostras de placa subgingival, por PCR. Considerando que os espécimes incluídos no presente estudo foram processados juntos, sem separação por grupo, pode-se sugerir que os dados obtidos para este grupo de indivíduos são igualmente confiáveis, embora um resultado tão divergente tenha sido observado. Características intrínsecas do grupo de estudo ou variações metodológicas entre diferentes estudos podem explicar as diferenças observadas.

Em indivíduos com mais de 45 anos de idade com periodonto sadio, van Winkelhoff et al. (2002) identificaram, empregando o método cultura-dependente, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em cerca de 50%, 70%, 10%, 90% e 10% das amostras de placa supra-gingival analisadas, respectivamente. No presente estudo, tais microrganismos foram detectados em cerca de 20%, 5%, 70%, 60% e 0% dos espécimes clínicos, respectivamente. *P. nigrescens* foi identificada em cerca de 5% dos espécimes clínicos estudados. Deve-se lembrar da dificuldade de diferenciação entre *P. intermedia/nigrescens* por cultura, o que pode explicar a taxa de detecção de *P. intermedia* de cerca de 70% relatada pelos autores.

A ausência dos dentes diminui a variedade de sítios para colonização bacteriana na cavidade oral. Os indivíduos edêntulos incluídos neste estudo apresentaram proporção menor de microrganismos, sendo mais frequentes *F. nucleatum* (cerca de 60%) e *A. actinomycetemcomitans* (cerca de 40%), não tendo sido observados *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Devides & Franco (2006) pesquisaram, por PCR, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* em pacientes edêntulos antes da colocação de implante mandibular e detectaram os

referidos organismos em aproximadamente 10%, 50% e em nenhuma das amostras analisadas, respectivamente. As diferenças observadas podem estar relacionadas ao desenho dos *primers* empregados nos dois estudos, o que leva a variações tanto na sensibilidade como na especificidade do teste laboratorial utilizado. Na ausência dos dentes, seja antes de sua erupção ou após a perda do elemento dental, os microrganismos mais prevalentes foram *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, o que demonstra a capacidade de adesão à superfície epitelial gengival apresentada por estas bactérias.

O implante dental, possivelmente devido à criação de um *habitat* semelhante à região periodontal natural, acarretou aumento na diversidade de microrganismos detectados, quando os resultados foram comparados com aqueles do grupo de edêntulos. De forma semelhante, *P. intermedia* e *P. gingivalis* não foram observados nas amostras clínicas obtidas dos dois grupos de indivíduos. Hultin et al. (2002), utilizando hibridização DNA-DNA e amostras de fluido do sulco gengival de pacientes com implantes dentários, observaram índice elevado de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola*. Os autores concluíram que há uma colonização bacteriana específica de acordo com o tipo e o tempo do implante. Já no presente estudo, os microrganismos mais prevalentes foram *F. nucleatum* (69,20%), *A. actinomycetemcomitans* (46,10%), *E. corrodens* (38,50%) e *T. forsythia* (30,80%). Estas variações, possivelmente, ocorreram por diferenças entre as metodologias empregadas e entre os tipos e tempo de uso dos implantes.

Diversos autores têm descrito a existência de relações sinérgicas e/ou antagonistas entre os microrganismos que constituem a microbiota da cavidade oral. A formação e a manutenção do biofilme dental baseia-se nas relações entre a

grande variedade de espécies bacterianas aí presentes e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (DAVEY & COSTERTON, 2006). É a manutenção do equilíbrio entre os constituintes do biofilme e com o hospedeiro que resultará em estado de saúde da região periodontal do indivíduo. Por estas razões, o conhecimento da microbiota do sítio e a compreensão das relações positivas ou negativas existentes entre os diferentes microrganismos presentes naquele *habitat* possibilitarão o esclarecimento do papel dos mesmos como promotores de saúde ou como agentes de doença e, em última análise, a utilização deste conhecimento para prevenção das doenças periodontais.

10 Ali et al. (1994), empregando sondas de DNA e espécimes clínicos de pacientes com periodontite, observaram associações positivas mútuas entre *F. nucleatum*/*T. forsythia*/*P. gingivalis* e concluíram que a presença de *P. intermedia* não influencia a colonização pelas espécies bacterianas anteriormente mencionadas (*F. nucleatum*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*). Ashimoto et al. (1996), estudando, por PCR, amostras de placa gengival/subgengival de pacientes com periodontite ou gengivite, observaram diversas associações positivas, por exemplo, entre *T. forsythia*/*T. denticola*, *T. forsythia*/*P. gingivalis*, *P. intermedia*/*T. denticola*, *P. gingivalis*/*P. intermedia*, *T. forsythia*/*P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*/*P. nigrescens*, *T. forsythia*/*P. nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans*/*T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*/*P. gingivalis*, *P. gingivalis*/*T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*/*T. denticola* e *P. gingivalis*/*P. nigrescens* com OR variando entre 2,75 e 14,60. Lana (2005) detectou, utilizando PCR, relações negativas entre *P. nigrescens*/*P. intermedia*, *T. denticola*/*T. forsythia* e *P. intermedia*/*T. denticola*, em pacientes com periodontite crônica. No grupo de pacientes com periodontite agressiva, a autora identificou relações positivas entre *T. forsythia*/*E. corrodens*, *E.*

*corrodens/T. denticola*, *P. intermedia/E. corrodens*, *P. nigrescens/Fusobacterium* spp., *T. forsythia/Fusobacterium* spp. e *T. forsythia/T. denticola* e relação negativa entre *T. denticola/T. forsythia*. Nos indivíduos com periodonto saudável, observou apenas relação positiva entre *T. denticola/E. corrodens*. *A. actinomycetemcomitans*,  
5 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola* são apontados por diferentes autores (AVILA-CAMPOS et al., 2002; ASHIMOTO et al., 1996; DARBY & CURTIS, 2001; LIEBANA et al., 2004; SAKAMOTO et al.; 2005; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005) como microrganismos fortemente relacionados à etiopatogenia da periodontite, seja isoladamente ou em associação. É possível que esta seja a razão  
10 para os resultados acima mencionados, observados por Ali et al. (1994), Ashimoto et al. (1996) e por Lana (2005), para os pacientes com periodontite.

Considerando-se o total de amostras analisadas no presente estudo, foram detectadas relações sinérgicas entre *F. nucleatum* e diversos microrganismos (TAB. 2). Relações antagonistas mútuas entre *T. denticola/P. intermedia/P.nigrescens*, *T. forsythia/P. intermedia*, *P. intermedia/F. nucleatum* e antagonistas entre *T. denticola/F. nucleatum*, *T. denticola/E. corrodens*, *T. denticola/A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia/F. nucleatum*, *T. forsythia/E. corrodens*, *T. forsythia/A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia/E.corrodens*, *P. intermedia/A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens/T. forsythia*, *P. nigrescens/F. nucleatum*, *P. nigrescens/E.corrodens* e *P. nigrescens/A. actinomycetemcomitans*  
15  
20 (TAB. 2).

À semelhança do resultado desta investigação, relação positiva entre *F. nucleatum/T. forsythia* também foi observada por Ali et al. (1994) em pacientes com periodontite, o que pode indicar que não apenas a relação entre os microrganismos,  
25 mas, principalmente, a proporção de cada um na relação é fator determinante da

saúde ou doença. Por outro lado, Ashimoto et al. (1996), empregando amostras de pacientes com periodontite/gengivite, detectaram relações positivas entre *P. intermedia*/*T. denticola* e *T. forsythia*/*P. intermedia*, diferentemente dos dados obtidos na presente investigação. De forma semelhante, Lana (2005) relatou a  
5 ocorrência de relação sinérgica entre *P. intermedia*/*T. denticola* em pacientes com periodontite crônica. Estes resultados indicam que o tipo de relação entre os integrantes da microbiota da cavidade oral o que determina, em última análise, sua constituição, pode ser diferente nos estados de saúde ou de doença. Relação positiva entre *T. denticola*/*E. corrodens* foi descrita por Lana (2005), para o grupo de  
10 indivíduos com periodonto saudável. Diferentemente, no presente estudo, relação antagonista entre os dois grupos microbianos foi observada.

*F. nucleatum* é considerado um microrganismo chave na formação do biofilme dental, interagindo positivamente com várias espécies e permitindo a colonização pelas mesmas por meio, provavelmente, da produção de mediadores de  
15 co-agregação. O microrganismo modifica o ambiente tornando-o adequado para a implantação e manutenção de organismos anaeróbios estritos (SHARMA et al., 2005). Esta suposição é ratificada pelos resultados da presente investigação: *F. nucleatum* exerce influência positiva sobre quatro das sete espécies estudadas (*A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. nigrescens* e *T. forsythia*) e não exerce  
20 influência negativa sobre nenhuma delas.

Analisando os dados citados anteriormente, nota-se que o método empregado para análise da microbiota da cavidade oral determina a “qualidade” dos resultados obtidos. A PCR, método escolhido neste estudo, tem sido amplamente utilizada para a detecção de microrganismos orais, com a conclusão de que é mais  
25 acurada do que os métodos microbiológicas tradicionais, como dito anteriormente.



Porém, deve-se salientar o fato de que todos os métodos são executados, no todo ou em parte, manualmente, o que aumenta o risco de erros e/ou contaminação. No caso da PCR não é diferente; uma amostra contaminada durante o procedimento pode levar a um resultado falso-positivo, por exemplo. Além disto, dois fatores

5 críticos podem interferir na eficiência da reação: temperatura de anelamento e concentração de magnésio. Altas temperaturas de anelamento e baixas concentrações de magnésio reduzem a sensibilidade do método, dificultando a detecção dos organismos. Por outro lado, baixas temperaturas de anelamento e altas concentrações de magnésio aumentam a sensibilidade de detecção, mas

10 diminuem a especificidade, o que pode resultar em reações cruzadas com formação de bandas inespecíficas. Portanto, padronizar as condições ideais de reação é fundamental para o bom funcionamento do método (ASHIMOTO et al., 1996). Com a padronização correta, a PCR se apresentou mais específica e sensível, quando, por exemplo, permitiu a distinção entre *P. intermedia* e *P. nigrescens*.

15 O aperfeiçoamento dos testes utilizados na detecção dos integrantes da microbiota da cavidade oral, principalmente dos organismos apontados como periodontopatógenos, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção da cárie e da doença periodontal. Assim, métodos mais rápidos e acurados, como a PCR, poderão contribuir significativamente para este objetivo,

20 possibilitando a detecção de espécies orais ainda desconhecidas, o entendimento das relações entre os membros da microbiota oral e o papel de cada um na etiopatogenia das doenças da cavidade oral.



- ❖ A microbiota oral torna-se mais diversificada após a erupção dos dentes, possivelmente devido à criação de novos *habitat*.
- ❖ *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* foram detectados em indivíduos de todas as faixas etárias, sendo, portanto, capazes de colonizar diferentes estruturas da cavidade oral.
- ❖ É possível que *P. gingivalis* não seja integrante da microbiota indígena da cavidade oral, uma vez que o organismo não é detectado em indivíduos sem lesões gengivais ou periodontais.
- ❖ A diversidade da microbiota oral mantém-se relativamente estável em adultos, resultado do equilíbrio entre os integrantes desta microbiota e o hospedeiro.
- ❖ A ação sinérgica de *F. nucleatum* sobre *T. forsythia*, *P. nigrescens*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* corrobora a hipótese de que este microrganismo desempenha papel fundamental na formação e manutenção do biofilme dental.
- ❖ Os dados obtidos reforçam a hipótese de que periodontopatógenos putativos são membros da microbiota indígena da cavidade oral.
- ❖ Diferenças observadas entre resultados deste estudo e dados divulgados por outros autores podem ser devidas a diferenças geográficas, o que torna necessária a realização de estudos desta natureza em diferentes localidades e envolvendo diferentes grupos étnicos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

1. AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OSLEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.5721-5732, nov. 2005.
2. ALI, R.W.; SKAUG, N.; NILSEN, R.; BAKKEN, V. Microbial associations of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis. **J. Periodontol.**, v.65, p.1053-1057, nov. 1994.
3. ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.11. p.266-273, ago. 1996.
4. AVILA-CAMPOS, M.J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.44. p.1-5, jan.-fev. 2002.
5. CHAN, E.C.S.; MCLAUGHLIN, R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.15. p.1-9, fev. 2000.
6. DARBY, I. & CURTIS, M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. **Periodontol. 2000**, v.26. p.33-53, jun. 2001.
7. DARVEAU, R.P.; TANNER, A.; Page, R.C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol. 2000**, v.14, p.12-32, jun. 1997.
8. DAVEY, M.E. & COSTERTON, J.W. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. **Periodontol. 2000**, v.42, p.13-26, out. 2006.
9. DEVIDES, S.L. & FRANCO, A.T. Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant supported prostheses submitted to immediate load. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.21, p.262-269, mar.-abr. 2006.
10. FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol. 2000**, v.40, p.50-76, 2006.

11. FINEGOLD, S.M.; STRONG, C.A.; MCTEAGUE, M.; MARINA, M. The importance of black pigmented Gram negative anaerobe in human infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.16, p. 77-82, mar. 1993.
  
12. FLEMMIG, T.F.; RÜDIGER, S.; HOFMANN, U.; SCHMIDT, H.; PLASCHKE, B.; STRÄTZ, A.; KLAIBER, B.; KARCH, H. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. **J.Clin.Microbiol.**, v.33, p. 3102-3105, 1995.
  
13. FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; FRASER, G.J.; PASTER, B.J.; SHAMES, B.; MURPHY, J.C. Intracellular Campylobacter – like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a Desulfovibrio sp. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1229-1237, maio 1994.
  
14. GIBBONS, R.J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious disease. **J. Dent. Res.**, v.68, p.750-760, maio 1989.
  
15. GREENSTEIN, G.; LAMSTER, I. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. **J. Periodontol.**, v.68, p.421-431, maio 1997.
  
16. GRENIER, D.; MAYRAND, D. Periodontitis as an ecological imbalance. In: KURAMITSU, H.K.; ELLEN, R.P. **Oral bacterial ecology: the molecular basis**. 1ed. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. Cap.6, p.275-310.
  
17. GUSBERTI, F.A.; MOMBELLI, A.; LANG, N.P.; MINDER, C.E. Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. **J. Clin. Periodontol.**, v.17, p.685-692, nov. 1990.
  
18. HILL, M.J.; MARSH, P.D. **Human microbial ecology**. CRC Press. Boca Raton/USA. 1990.
  
19. HILLMAN, J.D.; SOCRANSKY, S.S.; SHIVERS, M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.13, p.349-3458, Nov./Dez. 1985.
  
20. HULTIN, M.; GUSTAFSSON, A.; HALLSTRÖM, H.; JOHANSSON, L-A.; EKFIELDT, A.; KLINGE, B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. **Arch. Oral Biol.**, v.30, p.791-795, ago. 2002.

21. JANKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. **TRENDS in Microbiology**, v.13, p.589-595, 2005.
22. KAMMA, J.J.; DIAMANTI-KIPIOTI, A.; NAKOU, M.; MITSIS, F.J. Profile of subgingival microbiota in children with primary dentition. **J. Periodont. Res.**, v.35, p.33-41, abr. 2000.
23. KÖNÖNEN, E.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. The early colonisation of Gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.7, p.28-31, fev. 1992.
24. KÖNÖNEN, E.; ASIKAINEN, S.; SAARELA, M.; KARJALAINEN, J.; JOUSIMIES-SOMER, H. The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.9, p.136-141, jun. 1994.
25. KOOK, J.K.; SAKAMOTO, T.; NISHI, K.; KIM, M.K.; SEONG, J.H.; SON, Y.N.; KIM, D.K. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers of the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. **Microbiol. Immunol.**, v.49 (1), p.9-16, mar. 2005.
26. KÜLEKÇİ, G.; ÇİFTÇİ, S.; KESKIN, F.; KILIÇ, A.O.; TÜRKÖĞLU, S.; BADUR, S.; DEVELİÖĞÜ, O.N.; LEBLEBİCİOĞLU, B.; KÜLEKÇİ, M. PCR analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Fusobacterium nucleatum* in middle ear effusion. **Anaerobe**, v.7, p.241-246, out. 2001.
27. KURU, B.; MCCULLOUGH, M.J.; YILMAZ, S.; PORTER, S.R. Clinical and microbiological studies of periodontal disease in Sjögren's syndrome patients. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.92-102, fev. 2002.
28. LAMONT, R.J.; JENKINSON, H.F. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.** v.15, p.341-349, dez. 2000.
29. LANA, M.A. **Avaliação da ocorrência de periodontopatógenos em sítios periodontais de pacientes com e sem doença periodontal por cultura microbiológica e por reação de polimerização em cadeia.** 2005 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

30. LIÉBANA, J.; CASTILLO, A.M.; ÁLVAREZ, M. Periodontal diseases: microbiological considerations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v.9, Suppl:S75-91, 2004.
31. LOESCHE, W.J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol. Ver.**, v.50, p.353-380, dez. 1986.
32. MCNABB, P.C.; TOMASI, T.B. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.35, p.477-496, out. 1981.
33. MARCOTTE, H., LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.71-109, mar. 1998.
34. MARSH, P.; MARTIN M. **Oral Microbiology**. London. Chapman&Hill. 3.ed. 1992. 249p.
35. MARSH, P.D. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: KURAMITSU, H.K., ELLEN, R.P. **Oral bacterial ecology: the molecular basis**. 1 ed. Norfolk: Horozon Scientific Press, 2000, cap.1, p.12-67.
36. MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. Dental plaque as a biofilm. **J. Industrial Microbiology**, v.15, p.169-175, set. 1995.
37. MARSH, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v.149, p.279-294, fev. 2003.
38. MAYANAGI, G.; SATOZ, T.; SHIMAUCHI, H.; TAKAHASHI, N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.19, p.379-385, dez. 2004.
39. MOORE, W.E.; MOORE, L.V. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, v.5, p.66-77, jun. 1994.



40. MOUTON, C.; ROBERT, J.C. **Bacteriología bucodental**. 1ed. Barcelona: Masson, 1995. 183 p.
41. NORSKOV-LAURITSEN N.; KILIAN M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.56,p.2135-2146, set. 2006.
42. PEARCE, M.A.; DEVINE, D.A.; DIXON, R.A.; STEENBERGEN, T.J.M.VAN. Genetic heterogeneity in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella corporis* and related species isolated from oral and nonoral sites. **Oral Microbiol. Immunol.**,v.15, p.89-95, abr. 2000.
43. PEREA, E.J, Oral flora in the age of molecular biology. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v.9, Suppl:S1-10, 2004.
44. PREUS, H.R.; ZAMBON, J.J.; DUNFORD, R.G.; GENCO, R.J. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v.65, p.2-7, jan. 1994.
45. RIGGIO, M.P.; MACFARLANE, T.W.; MACKENZIE, D.; LENNON, A.; SMITH, A.J.; KINANE, D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Periodontol. Res.**, v.31, p.496-501, out. 1996.
46. SAKAI, V.T., **Detecção de bactérias periodontopatogênicas na saliva de crianças em fase de dentição mista**. 2005. Disponível em: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_ion=&co\\_obra=29960](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_ion=&co_obra=29960) Acesso em: 05/01/2007 Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.
47. SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. **J. Periodont. Res.**, v.40, p.277-285, jun. 2005.

48. SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Plainview: Cold Harbor Laboratory Press, 1989. Vol2.
49. SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.31, p.107-133, 1977.
50. SCHENKEIN, H.A.; BURMEISTER, J.A.; KOERTGE, T.E.; BROOKS, C.N.; BEST, A.M.; MOORE, L.V.; MOORE, W.E. The influence of race and gender on periodontal microflora. **J. Periodontol.**, v.64, p.292-296, abr. 1993.
51. SHARMA, A.; INAGAKI, S.; SIGURDSON, W.; KURAMITSU, H.K. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. **Oral Microbiol. Immunol.** v.20, p.39-42, fev. 2005.
52. SIQUEIRA Jr, J.F.; RÔÇAS, I.N. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.3314-3319, jul. 2005.
53. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CIGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L. Microbial complex in sugengival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.134-144, fev. 1998.
54. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiologia da doença periodontal In: Lindhe, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 4, p.92-126.
55. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol. 2000**, v.38, p.135-187, jun. 2005.
56. TANNER, A.C.R.; IZARD, J. *Tannerella forshytia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. **Periodontol. 2000**, v.42, p.88-113,2006.
57. TRAN S.D.; RUDNEY, J.D. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.2674-2678, nov. 1996.
58. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. Dent. Res.**, v.73, p.672-681, mar. 1994.

59. VAN WINKELHOFF, A.J.; LOOS, B.G.; VAN DER REIJDEN, W.A.; VAN DER VELDEN U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.1023-1028, nov. 2002.
60. XIMÉNEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.648-657, set. 2000.
61. ZAMBON, J.J. Periodontal diseases: microbial factors. **Ann. Periodontol.**, v.1, p.879-925, nov. 1996.



**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:**

Presença de alteração periodontal

Presença de alterações sistêmicas (infecção por HIV, diabetes mellitus, leucemia, etc)

Uso de antimicrobianos nos últimos 3 meses

Uso de antiinflamatórios nos últimos 30 dias

Uso de imunossupressores nos últimos 30 dias

Alcoolismo

**A) IDENTIFICAÇÃO**

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos \_\_\_\_ meses

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Telefone: ( \_\_\_\_ ) \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

**B) HISTÓRIA SOCIAL E FAMILIAR**

1. Renda familiar: \_\_\_\_\_ salários mínimos (R\$ \_\_\_\_\_, 00)

2. Número de pessoas habitando a mesma casa: \_\_\_\_\_

3. Escolaridade:

do paciente: primário                      secundário                      superior

do pai: primário                              secundário                      superior

da mãe: primário                              secundário                      superior

4. Casa servida por esgoto: Sim                      Não

5. Consumo de água tratada: Sim                      Não

**C) HISTÓRIA PREGRESSA**

1. Aleitamento materno: Sim                      Duração: \_\_\_\_\_ meses

Não

2. Tabagismo: Sim    Duração: \_\_\_\_\_ anos                      Quantidade: \_\_\_\_\_ cigarros/dia

Não

**D) HISTÓRIA ODONTOLÓGICA**

1. Erupção dos dentes: \_\_\_\_\_ meses de idade

2. Tratamento dentário anterior: Sim                      Não

Qual?

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

3. Higiene bucal:

Escovação: \_\_\_\_\_ / dia

Uso de fio dental: \_\_\_\_\_ / dia

Uso de antisséptico bucal: \_\_\_\_\_ / dia                      Qual? \_\_\_\_\_

4. Consumo de sacarose: Satisfatório                      Insatisfatório

5. Uso de fluoreto:

Sim Tópico Bochecho \_\_\_\_\_ vezes/dia Concentração: \_\_\_\_\_  
Não

E) EXAME E DIAGNÓSTICO DENTÁRIO:

1. Tipo de dentição: decídua mista permanente  
2. Placa: inexistente visível abundante  
3. Sangramento: presente espontâneo à sondagem  
ausente

Dente  Aspecto Clínico  Dente  Aspecto

Clínico   17   37   16   36   15/55   35/75   14/54   34/74   13/5  
3   33/73   12/52   32/72   11/51   31/71   21/61   41/81   22/62   
 42/82   23/63   43/83   24/64   44/84   25/65   45/85   26   46   
  27   47

Sítios amostrados:

\_\_\_\_\_

Data da colheita:

\_\_\_\_\_

Local da colheita:

\_\_\_\_\_

Responsável:

\_\_\_\_\_

OBSERVAÇÕES:

Termo de Consentimento Pós-Informação Para Participação em Pesquisa, Conforme Resolução Número 196 de 10/10/96 do Conselho Nacional de Saúde

Título:

“Avaliação da microbiota gengival e subgengival de seres humanos por métodos microbiológico e molecular”

Sub-projeto:

“Avaliação da microbiota gengival e subgengival de seres humanos por PCR”

Coordenador do Projeto:

Edilberto Nogueira Mendes

Introdução:

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a explicação a seguir sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis para você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo. Se você não for honesto com seu dentista em relação a suas queixas e história, você poderá prejudicar a você mesmo ao participar deste estudo.

Objetivos:

Avaliar a constituição da microbiota gengival e subgengival, por hibridação DNA-DNA e por reação de polimerização em cadeia, de indivíduos sem manifestação clínica de doença periodontal, dos seguintes grupos: crianças antes da erupção dos dentes; crianças com dentição decídua completa; crianças, adolescentes e idosos com dentição permanente completa; indivíduos adultos desdentados sem prótese total e indivíduos com implante dental.

Investigar os tipos morfológicos bacterianos encontrados nos espécimes clínicos (método de Gram).

Resumo:

A microbiota indígena desempenha importantes funções protetoras em seres humanos e animais e constitui, também, importante reservatório de microrganismos que podem causar infecções nas diversas regiões do organismo. Na cavidade bucal, a microbiota está associada com a etiologia de duas doenças infecciosas prevalentes no ser humano, em todas as regiões do mundo - a cárie e a doença periodontal - resultado da alteração do equilíbrio entre fatores de defesa do hospedeiro e microbiota indígena. Ao longo da vida do indivíduo, a microbiota bucal sofre diversas alterações, resultado de mudanças no hospedeiro e no ambiente. Tem sido estimado que centenas de espécies constituem a microbiota bucal. A maior parte do conhecimento referente à sua composição advém do isolamento dos microrganismos em meios de cultura artificiais. O método da cultura microbiológica é dispendioso, demorado, complexo, de difícil manutenção e não apresenta sensibilidade suficiente para a detecção de quantidade pequena de organismos. O isolamento, mesmo de espécies presentes em quantidade apreciável, é dificultado pela grande quantidade e diversidade de organismos da microbiota. O surgimento, recente, de métodos moleculares, tem revolucionado a taxonomia bacteriana; novos gêneros foram criados ou divididos/agrupados e novas espécies foram descritas ou transferidas para outros gêneros e microrganismos ainda não cultivados foram detectados. Calcula-se que cerca de 50% dos microrganismos que constituem a microbiota bucal não foram, ainda, isolados. Desta forma, métodos moleculares podem contribuir de forma substancial para o conhecimento da microbiota da cavidade bucal, em diferentes locais do mundo e grupos populacionais e, em última análise, para o

desenvolvimento de estratégias para o tratamento e prevenção de duas doenças infecciosas prevalentes em todo o mundo - a cárie e a doença periodontal.

**Procedimento:**

Se você tem indicação para tratamento odontológico e não apresentar doença periodontal, você pode ser selecionado. Não serão incluídos no estudo, pacientes portadores de alterações sistêmicas ou em uso de antimicrobianos. Caso você concorde em participar, um cone de papel absorvente será inserido na bolsa periodontal, por 60 segundos, ou friccionado delicadamente na gengiva e transferido, imediatamente, para solução de transporte. Utilizando cureta periodontal, a placa bacteriana subgengival será colhida, com leve raspagem, e transferida para solução de transporte.

Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão à sua disposição a qualquer momento da pesquisa.

Não haverá nenhum custo para você com sua inclusão no estudo.

Você não receberá qualquer remuneração pela participação na pesquisa.

**Desconfortos:**

O procedimento de colheita não gera nenhum desconforto.

**Benefícios:**

Sua participação será muito importante para o conhecimento da microbiota gengival e subgengival, fornecerá informações importantes para o conhecimento da infecção periodontal e poderá contribuir, no futuro, para a melhoria do controle da infecção e da saúde bucal.

**Confidencialidade:**

Os resultados serão mantidos em sigilo até onde é permitido pela lei. O Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição poderá verificá-los e ter acesso aos dados que identificam seu nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao concordar com sua participação, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o órgão financiador, para a Instituição e para o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

**Desligamento:**

Você poderá se afastar, a qualquer momento, sem prejuízo para o seu acompanhamento odontológico. O órgão financiador do estudo (se houver) poderá finalizar a sua participação nesta pesquisa por falta de recursos por parte do financiador ou por não preenchimento de critérios de inclusão por parte do paciente.

**Novas descobertas:**

Todos os novos dados desta pesquisa serão fornecidos a você.

**Contato com o pesquisador:**

Pode ser feita pelo telefone 3248 9774. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você deverá ligar para o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG no número 3499 4592.

**Consentimento:**

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou participando voluntariamente desta pesquisa, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, ..... de ..... de .....

-----  
Nome do paciente:

RG:

Idade:

Endereço:

Testemunhas

-----

-----

-----



Nome: Nome:

RG: RG:

Endereço: Endereço: